

カルシトニンを用いた  
ペプチド・蛋白の  
経肺吸収に関する研究



小 林 晋 三

カルシトニンを用いたペプチド・蛋白の  
経肺吸収に関する研究

小 林 晋 三

# 目次

緒言.....	3
第1章 ラットにおけるサケカルシトニンの経肺吸収.....	4
序論.....	4
材料と方法.....	4
試薬.....	4
動物実験.....	5
結果.....	6
筋肉内投与、気管内投与によるカルシトニンの生物学的活性.....	6
経肺投与によるカルシトニンのバイオアベイラビリティ.....	7
脂肪酸、界面活性剤の吸収促進効果.....	7
蛋白分解酵素阻害剤の吸収促進効果.....	8
肺ホモジェネートによるカルシトニンの分解とその阻害.....	8
酵素阻害剤によるカルシトニンの分解阻害.....	9
カルシトニンの分解に対する脂肪酸、界面活性剤の阻害作用.....	10
考察.....	11
第2章 ヒト肺胞由来 A549細胞の培養単層におけるペプチド・ 蛋白の透過.....	13
序論.....	13
材料と方法.....	13
結果と考察.....	15
各薬物の透過係数.....	15
透過係数と分子量の相関.....	19
透過機序.....	19
安定性.....	20
透過の方向性.....	20
第3章 ペプチド・蛋白の経肺吸収に及ぼす決定因子（透過バ リアーと代謝バリアー）.....	21
序論.....	21
材料と方法.....	21
結果.....	23
ラットにおける経肺吸収.....	23
肺ホモジェネート中における安定性.....	26
考察.....	26

第4章 ヒト肺胞由来 A549細胞におけるオレイン酸の吸収促進作用とそのメカニズム.....	28
序論.....	28
材料と方法.....	28
結果.....	29
吸収促進剤の透過性に及ぼす影響.....	29
吸収促進剤の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に及ぼす影響.....	31
細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度のオレイン酸の効果に対する影響.....	31
吸収促進作用に対する細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 伝達系阻害剤の影響.....	32
細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇に及ぼす細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 伝達系阻害剤の影響.....	32
考察.....	34
第5章 サケカルシトニンドライパウダーのラットにおける経肺吸収.....	36
序論.....	36
材料と方法.....	36
結果.....	38
ドライパウダーと溶液によるカルシトニンのラットにおける経肺吸収.....	38
肺内分布.....	40
考察.....	41
結語.....	43
謝辞.....	45

# 緒言

近年、遺伝子工学の長足の進歩はペプチド・蛋白系医薬品をマーケットにもたらした。しかし、その多くは静脈内投与、皮下投与など侵襲性的の方法により投与されている。当然それに代わるものとして、経口投与、経鼻投与など非侵襲的な投与経路が精力的に研究され、その努力は今も続いているが、吸収部位での透過性と代謝といった難関を完全に克服できる方法は確立していない<sup>14)</sup>。こうした状況の中で、最近、より簡便な投与方法として経肺投与が検討され、その有効性が注目されている<sup>3,5-7)</sup>。人では肺上皮表面の面積が $75\sim 100\text{m}^2$ と、鼻粘膜上皮の面積よりも極めて広く、これは小腸上皮の表面積に相当する<sup>8)</sup>。また、毛細血管網によって囲まれている肺胞上皮層は $0.5\mu\text{m}\sim 1\mu\text{m}$ と薄く、高分子物質においても透過しやすいと考えられる<sup>9)</sup>。そして、吸収された薬物は直接大循環に入るため、肝臓での初回通過効果を受けない点も経口投与に比べ大きな利点である。こうした経肺投与の特徴により、他の経粘膜投与よりも優れた吸収が期待され、事実、それを示す報告も多い<sup>5,10-12)</sup>。しかし、ペプチド・蛋白系医薬品を吸入剤として開発するために必要な吸収部位での透過や代謝に関する基礎的なデータの蓄積は十分ではない。そこで、本研究では、骨疾患治療薬であるサケカルシトニンモデル薬物とし、ペプチド・蛋白の経肺吸収に関する基礎的検討を行った。

本論文は、以下の5つの章により構成されている。第1章では、ラットにおけるカルシトニンの経肺吸収を検討した。特に、蛋白分解酵素阻害剤ならびに吸収促進剤を用いて、透過バリアーと代謝バリアーについて調べた。第2章では、吸収部位である肺胞上皮におけるペプチド・蛋白の透過経路を明らかにするため、ヒト肺胞由来細胞株A549細胞培養単層を用いた検討を詳細に行った。第3章ではさらに、ペプチド・蛋白の経肺吸収における透過バリアーと代謝バリアーのどちらがより決定的な影響因子であるか解明を試みた。すなわち、両バリアーの指標として、ラットにおけるペプチド・蛋白のバイオアベイラビリティと分子量の相関性、そして肺ホモジェネート中での安定性を検討した。第4章では、優れた吸収促進作用を示したオレイン酸の作用メカニズムをA549細胞を用いて詳細に検討した。特に、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 制御との観点から考察した。第5章では、ペプチド・蛋白の経肺吸収の可能性をさらに検討するため、臨床投与剤型であるドライパウダー化したカルシトニンの経肺吸収と吸収促進剤の効果を動物実験により調べた。こうした研究で得られた基礎的知見にもとづき、経肺吸収での製剤学的なアプローチの可能性について考察を加えた。

# 第1章 ラットにおけるサケカルシトニンの経肺吸収<sup>13)</sup>

## 序論

慢性疾患の治療や予防に用いられる医薬品の投与には非侵襲性の投与経路が望まれ、骨疾患の治療に適用されるカルシトニンもその例外ではない。緒言に述べたように、ペプチド系薬物の非侵襲的投与方法として経肺投与は、経口投与、経鼻投与、経皮投与、直腸内投与以上に期待されている<sup>3,5)</sup>。しかし、ペプチド・蛋白を対象とした経肺投与の研究が活発に報告されるようになったのは最近であり、他の粘膜に比べ、代謝バリアーや透過バリアーについて分かっていないことが多い<sup>14,15)</sup>。本章では、代表的ペプチド系薬物の一つであるサケカルシトニンをラットに経肺投与し、蛋白分解酵素阻害剤及び吸収促進剤の効果を調べ、肺胞上皮粘膜の透過バリアーと酵素的代謝バリアーについて検討した。

## 材料と方法

### 試薬

本研究に用いた試薬は以下の製品であった。サケカルシトニン（以下カルシトニン）、キモスタチン、ポテトカルボキシペプチダーゼ阻害剤、ホスホラミドン、アンチパイン、ロイペプチン、ベスタチン、フォロキシミチン、アマスタチン、ペプスタチン、エラスチナール、Tos-Lys-クロロメチルケトン (TLCK)、Tos-Phe-クロロメチルケトン (TPCK)、3,4-ジクロロイソクマリン (3,4-DCI)、E-64はシグマ製、D-Tyr-Pro-Arg-クロロメチルケトンは、バツケム製、パラアミノフェニルメタンスルフォニールフルオリド (p-APMSF)、ダイズトリプシン阻害剤 (STI)、ジイソプロピルフルオロリン酸 (DFP)、バシトラシン、ベンザミジンは和光純薬製、アプロチニンはベーリングベルケ製を用いた。脂肪酸、界面活性剤は、純度95%以上の日本油脂製である。

試薬は次の方法により調製した。カルシトニン原液は、精製水で調製後、-40℃で保存、2ヶ月以内に使用した。ペプスタチン、キモスタチンは、0.1N HClで、TPCK、3,4-DCIは、ジメチルスルフォキシド(DMSO)で、他の阻害剤は精製水で調製し、原液とした。カルシトニンまたは阻害剤の原液を動物実験ではPhosphate Buffered Saline (PBS)で、*in vitro*実験では0.1M Tris-HCl buffer (pH7.4)で希釈使用した。どの薬液でもDMSOの最高濃度は1%を超えないように調製し、pHは7.4に微調整した。界面活性剤と遊離脂肪酸も同様に、動物実験ではPBS、*in vitro*実験ではTris-HCl buffer中で溶解、懸濁した。遊離脂肪酸の場合にはさらに2分間の超音波処理によりミセル化し、使用した。

## 動物実験

経肺投与実験はEnna & Schanker<sup>16)</sup>の方法に従った。ラットは7～8週齢のSD (Sprague-Dawley) 系雄性ラット(体重200～300g)を用いた。実験前に18～20時間絶食させたラットをウレタン麻酔後、背位固定し、頸部を切開して気管支を露出した。気管支の4番目と5番目の輪状軟骨の間を1/2幅にメスで切り、ポリエチレンチューブ(ヒビキ#6、長さ4.5cm)を気管支切開部から2.0cm挿入した。アロンアルファでチューブを固定し、皮膚切開部をミッフェル針で閉じた。約20分から40分間放置後、100 $\mu$ l用マイクロシリンジを用い、カニューレションしたチューブを通して薬液を肺内へ注入した。動物は、投与後約1分間立位で保持した後、37℃のホットプレート上で背位固定した。薬液の投与は、体重300gあたり100 $\mu$ lを気管内に注入した。筋肉内投与では、大腿部筋肉に同量を注射した。対照群では、カルシトニンを含まないPBSのみを投与した。

## 生物学的活性の測定

投与後5時間、経時的に尾静脈より採血し、血漿を遠心分離した(シェアセップを使用)。生物学的活性の指標である血漿中のカルシウム濃度は、和光純薬製カルシウムテストワコーCを用いて測定した。投与15分、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間後の血漿中カルシウムの投与前値に対する減少率を求め、0～5時間における減少率曲線と、生理食塩水投与群で得られた曲線との間に囲まれる面積 (Area of Ca Reduction: ACR)を台形方式により計算した。この値をカルシトニン生物活性を示す指標として用いた。1群4匹から6匹を用い、統計学的検定にはStudentのt検定法を適用した( $P<0.01$ )。

## 肺ホモジェネートによるカルシトニンの分解

6匹のラット肺をプールし、冷生理食塩水にて洗浄した後、組織重量1gあたり4倍量の0.1M Tris-HCl buffer (pH7.4)、0.2M サッカロースを添加し、ポリトロンで氷冷下間欠的に約3分間ホモジェナイズした。このホモジェネート液を4℃、4,500xgで30分間遠心し、その上清を、再度50,000xg、30分間遠心分離を行った。得た上清を細胞質画分とし、この沈渣を10mM Tris-HCl buffer (pH7.4)で2回洗浄し、再び同様に遠心して得た沈渣を膜画分とした<sup>14)</sup>。

基質溶液はカルシトニンの最終濃度が50 $\mu$ Mになるよう0.1M Tris-HCl buffer (pH7.4)で調製した。この基質100 $\mu$ lに、酵素溶液25 $\mu$ l、さらに蒸留水、酵素阻害剤または吸収促進剤25 $\mu$ lを添加した後、37℃で30分反応させた。酵素濃度は、酵素量に対して酵素反応が直線的に増加する範囲で使用した。酵素阻害剤の最終濃度は100 $\mu$ Mから10mM、吸収促進剤添加濃度は0.5%であった。酵素反応の停止には10% トリフルオロ酢酸10 $\mu$ lを加え、さらに7,000xg、3分の遠心により除蛋白した上清中の残存カルシトニン量を、HPLCにより測定

し、初期カルシトニン量との差から酵素活性を算出した。HPLCのカラムにはVydac製 (Protein & Peptide 0.4x15cm)を用い、測定波長は215nmとした。溶出液には0.1% トリフルオロ酢酸を含んだ32% アセトニトリル液を使用し、流速は1.7ml/minに設定した。この条件で、カルシトニンのピークは約7分に位置した。酵素溶液中の蛋白質の定量はプロテインアッセイキット (Bio-Rad) を使用した。

## 結果

### 筋肉内投与、気管内投与によるカルシトニンの生物学的活性

Figure 1-(A)に示したように、カルシトニン $0.2\mu\text{g/kg}$ 、 $0.4\mu\text{g/kg}$ 筋肉内投与すると血漿中カルシウム濃度の減少率は投与後1時間にピークを向かえ、5時間後には、ほぼ正常レベルまで回復した。一方、投与量 $1\mu\text{g/kg}$ 、 $2\mu\text{g/kg}$ 、 $4\mu\text{g/kg}$ 、 $8\mu\text{g/kg}$ では、投与後5時間まで、カルシウムの減少が継続した。高投与量側ではカルシトニンの活性はやや飽和する傾向にあった。PBS対照群では、血漿カルシウムレベルは変化しなかった。

Figure 1-(B)にカルシトニンを気管内投与した時の血漿カルシウム減少率を表した。気管内投与では、投与用量に依存したカルシウムの減少が観察された。投与量 $4\mu\text{g/kg}$ と $8\mu\text{g/kg}$ では、 $1\mu\text{g/kg}$ 以上を筋肉内投与した時に得られたのと同様なカルシウム減少パターンを示した。 $0.2\mu\text{g/kg}$ 投与群及び、対照群では、血漿カルシウムレベルは変化しなかった。

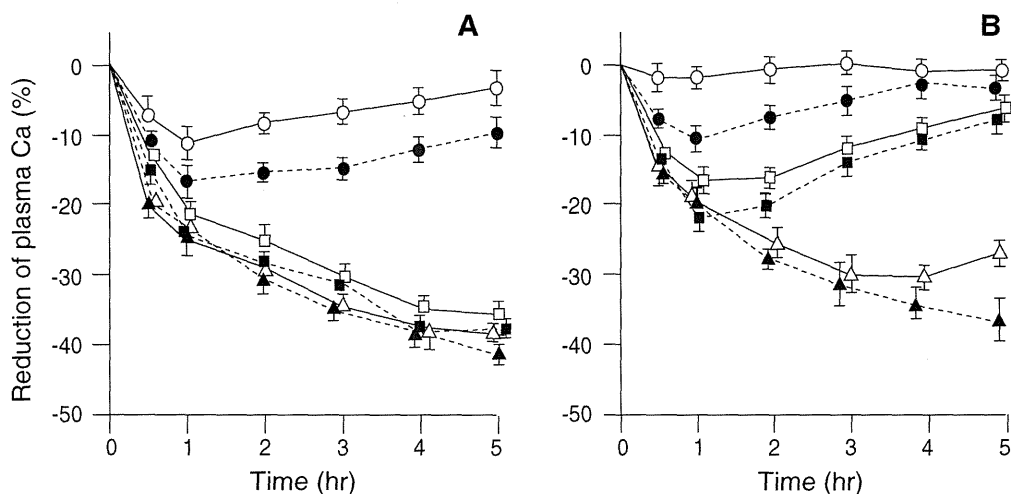


Figure 1-(A),(B). Efficacy of salmon calcitonin after intramuscular (A) or transpulmonary administration (B) in rats (n=6). Calcitonin was given at  $0.2\mu\text{g/kg}$ (○),  $0.4\mu\text{g/kg}$ (●),  $1\mu\text{g/kg}$ (□),  $2\mu\text{g/kg}$ (■),  $4\mu\text{g/kg}$ (△) and  $8\mu\text{g/kg}$ (▲).



## 経肺投与によるカルシトニンのバイオアベイラビリティー

カルシトニンの生物学的活性を、筋注時と経肺投与時で比べるため、ACRを投与量に対してプロットした (Figure 2)。筋肉内投与では、 $0.2\mu\text{g/kg} \sim 2\mu\text{g/kg}$ 投与量において、経肺投与では、 $0.4\mu\text{g/kg} \sim 4\mu\text{g/kg}$ において直線関係が得られた。生物学的活性にもとづく相対的バイオアベイラビリティー(B.A.(%)は、上記ACRの比率 (気管内投与/筋注投与) より計算すると、30%であった。

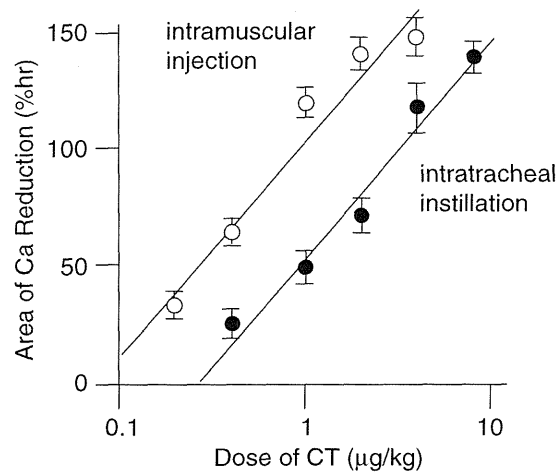


Figure 2. Dose-efficacy response of calcitonin after intramuscular administration (○) and intratracheal administration (●) in rats. Each point represents Mean  $\pm$  SE

## 脂肪酸、界面活性剤の吸収促進効果

Figure 3は、各種界面活性剤と脂肪酸誘導体を0.5%添加したときのカルシトニンの吸収を示している。遊離不飽和脂肪酸であるオレイン酸、パルミトレイン酸、リノ

Figure 3は、各種界面活性剤と脂肪酸誘導体を0.5%添加したときのカルシトニンの吸収を示している。遊離不飽和脂肪酸であるオレイン酸、パルミトレイン酸、リノ

Figure 3は、各種界面活性剤と脂肪酸誘導体を0.5%添加したときのカルシトニンの吸収を示している。遊離不飽和脂肪酸であるオレイン酸、パルミトレイン酸、リノ

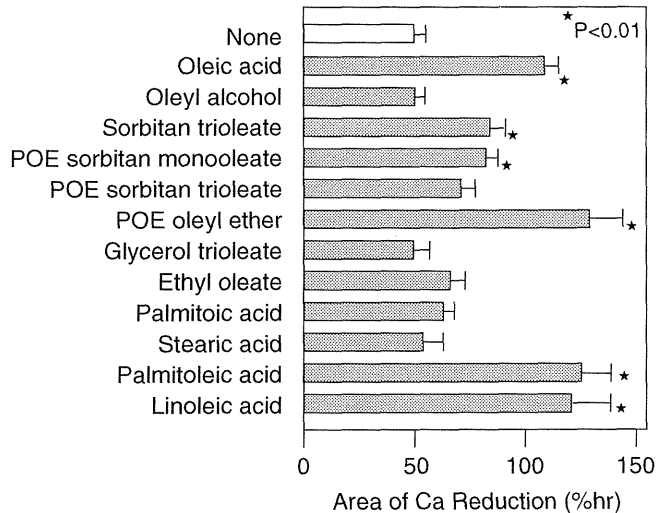


Figure 3. In vivo enhancing effects of fatty acids and surfactants on the pulmonary absorption of calcitonin in rats. The enhancer was given at 0.5% simultaneously with calcitonin ( $1\mu\text{g/kg}$ ). Each point represents the mean  $\pm$  SE (n=4~6).

レイン酸は極めて強い吸収促進作用を示した。ポリオキシエチレン(POE)オレイルエーテルは優れた吸収促進作用を有していた。それに比べ、ソルビタントリオレエート、POEソルビタンモノオレエート、POEソルビ

タン trioレエートの促進作用は弱く、グリセロール trioレエート、エチルオレエート、オレイルアルコールの促進作用はほとんどなかった。

## 蛋白分解酵素阻害剤の吸収促進効果

Figure 4に示した蛋白分解酵素阻害剤をカルシトニンと一緒に経肺投与し、カルシウム低下作用の促進を調べた。バシトラシン、キモスタチン、ポテトカルボキシペプチダーゼ阻害剤、ホスホラミドンは著明な吸収促進効果を示した。またアンチパイン、ロイペプチン、DFP、TLCKも中程度にカルシウム低下作用を促進した。他の阻害剤では吸収の促進はほとんど認められなかった。

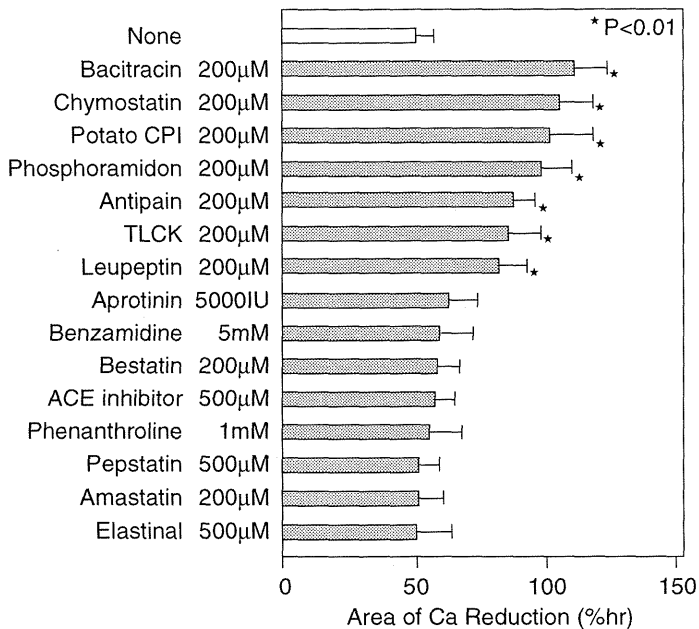


Figure 4. Absorption enhancing effects of protease inhibitors on the pulmonary absorption of calcitonin in rats. The enhancer was given simultaneously with calcitonin (1μg/kg). Each point represents the mean  $\pm$  SE (n=4-6).

## 肺ホモジェネートによるカルシトニンの分解とその阻害

ホモジェネート中の総蛋白濃度あたりのカルシトニン分解活性を測定した結果、膜画分中の活性は、細胞質画分中の4倍高い活性を示した。

## 酵素阻害剤によるカルシトニンの分解阻害

カルシトニン分解酵素に対するペプチド・蛋白分解酵素阻害剤の阻害率をFigure 5に示した。膜画分由来の酵素に対して、セリンプロテアーゼ阻害剤（キモスタチン、アンチパイン、ロイペプチン、D-Tyr-Pro-Arg-CK、DFP、TLCK）は60%以上の阻害率を示した。特に、ロイペプチン、アンチパインは細胞質画分の酵素に対して効果がなかったが、膜酵素には強い阻害を發揮した。逆に細胞質画分由来の酵素に対して阻害を示したセリンプロテアーゼ阻害剤（p-APMSF、3,4-DCI、アプロチニン、ダイズトリプシン阻害剤）は膜由来酵素には効果が弱かった。メタロプロテアーゼ阻害剤、ホスホラミドンは、膜画分由来酵素に特異的な抑制を示したが、EDTA、フェナンスロリンは、逆に細胞質画分により強く作用した。バシトラシンとポテトカルボキシペプチダーゼ阻害剤は、膜画分と細胞質画分両方に強い抑制効果を持っていた。チオールプロテアーゼ阻害剤E-64は、膜画分酵素のみに弱い阻害を示した。これ以外の阻害剤、アミノペプチダーゼ阻害剤（ベスタチン、アマスタチン）、エラスターゼ阻害剤（エラスチナール）、ACE阻害剤（フォロキシミチン）、アスパラギン蛋白分解酵素阻害剤（ペプスタチン）は、両画分に対して、阻害作用を示さなかった。

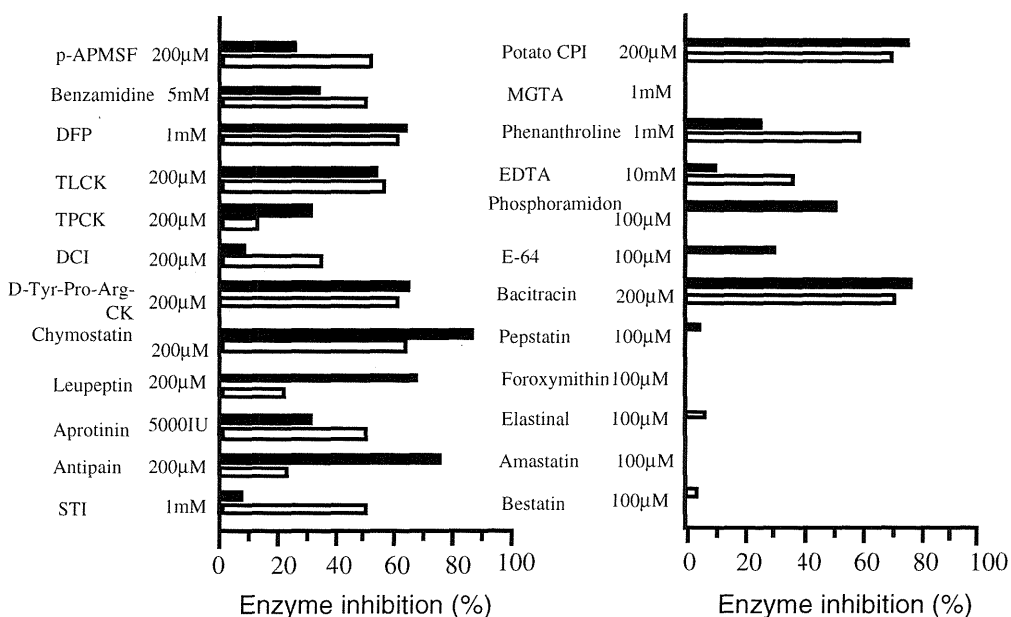


Figure 5. Inhibitory effects of protease inhibitors on salmon calcitonin degradation by membrane enzyme (closed bar) and cytosol enzyme (open bar). Each bar represents the mean of duplicates assays.

*In vivo*におけるペプチド・蛋白阻害剤の吸収促進作用と*in vitro*でのカルシトニン分解酵素に対する阻害効果の相関性をFigure 6に示した。膜画分由来の酵素では比較的良好な相関関係が認められたが、細胞質画分由来の酵素では相関しない阻害剤が多かった。特に相関曲線からはずれた阻害剤は、ホスホラミドン、フェナンスロリン、ベンザミジン、アプロチニンであった。

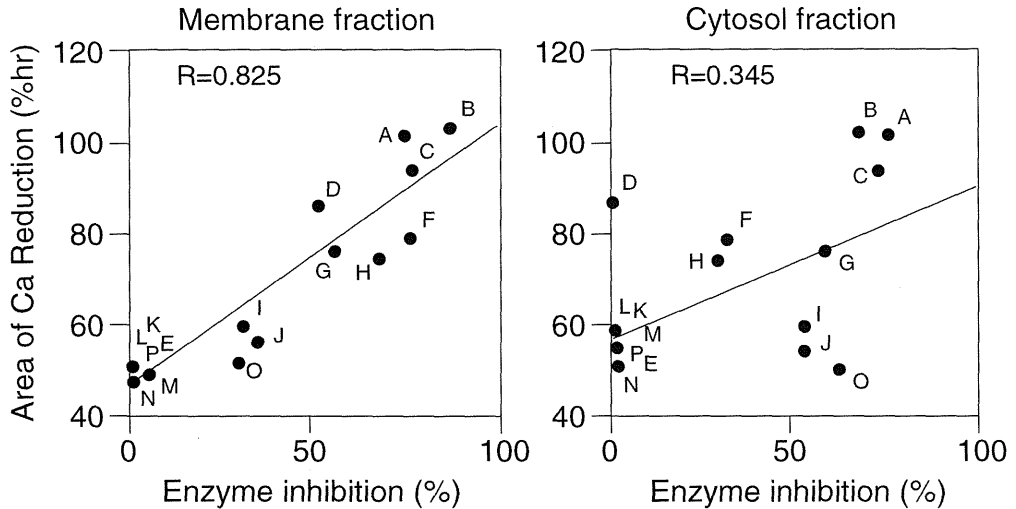


Figure 6. Relationship between absorption enhancing activity and calcitonin-degrading enzyme inhibition by protease inhibitors. Alphabets represent A;bacitracin, B;chymostatin, C;potato carboxypeptidase, D;phosphoramidon, E;pepstatin, F;antipain, G;TLCK, H;leupeptin, I;aprotinin, J;benzamidine, K;elastinal, L;bestatin, M;ACE inhibitor, N;amastatin, O;phenanthroline,P;no inhibitor.

#### カルシトニンの分解に対する脂肪酸、界面活性剤の阻害作用

いずれの脂肪酸、界面活性剤も両画分中の酵素による分解に対して阻害作用を示さなかった。

## 考察

一般に、ペプチド・蛋白系薬物の経粘膜吸収では透過バリアーと代謝バリアーが吸収率を下げる大きな要因となる<sup>1)</sup>。カルシトニンの経肺吸収でも、30%というバイオアベイラビリティや、透過促進剤、蛋白分解酵素阻害剤の効果から両バリアーの関与が示された。特に、(1) 肺ホモジェネート中のカルシトニン分解活性と(2) 蛋白分解酵素阻害剤による*in vitro* 阻害効果と*in vivo*での吸収促進効果の相関性から、膜画分が主として吸収部位でのカルシトニンの不活化に関わっていると推察された。ただし、*in vivo*で細胞質画分の酵素が阻害されるには、細胞内に阻害剤が入ることが必要であり、細胞質画分で*in vivo*促進効果と*in vitro* 阻害作用の相関性が低くなる原因のひとつとして考慮すべきである。インスリンは肺胞の細胞質画分中アミノペプチダーゼで主として代謝されると報告されており<sup>14)</sup>、同じ肺組織でも、代謝に関与する主たる部位がペプチドによって異なることを示している。

肺ではエンケファリナーゼ、アミノペプチダーゼ、エラスターゼ、アンジオテンシン転換酵素、カルボキシペプチダーゼ、中性エンドペプチダーゼなどがペプチドを代謝する酵素として知られているが<sup>14,17,18)</sup>、サケカルシトニンの分解酵素に関しては報告されていない。他粘膜組織では、アプロチニン、ベンザミジンが<sup>4)</sup>、直腸内投与ではベスタチン、ペプスタチン Aがカルシトニンの吸収を促進する<sup>19)</sup>。これらの阻害剤は経肺投与では促進作用を示さないことから、各粘膜上皮に存在するカルシトニン分解酵素の種類と構成比が異なっていると推測される。

本研究によりカルシトニンが主としてセリンプロテアーゼとメタロプロテアーゼにより代謝されることを明らかにした。ポテトカルボキシペプチダーゼ阻害剤とバシトラシン<sup>1)</sup>も両画分由来の酵素を強く阻害したが、ペプチド基質として非特異的な阻止作用を示した可能性もある。またポテトカルボキシペプチダーゼ阻害剤の非特異的な阻害作用も次の事実より示唆される、(1) 合成化合物のカルボキシペプチダーゼ阻害剤であるMGTAが全く阻害作用を示さない、(2) カルボキシペプチダーゼに抵抗性を持つようカルシトニンのC末端のL-プロリン残基をD-プロリン残基に置換した誘導体も容易に不活化される(データは省略)。さて、肺ホモジェネートの実験で得た結果を解釈するときは、その限界を認識しなくてはならない。肺は複数のタイプの細胞で構成されており、ホモジェネートでは全ての細胞が含まれていること、そしてホモジェネート調製は酵素の活性化・不活化を人為的に引き起こすからである。

Nivenら<sup>20)</sup>は単離還流肺を用いてオレイン酸、Span 85、オレイルアルコールの順に吸収促進効果が強いと、本結果と一致する報告をしている。特に、オレイン酸などの不飽和脂肪酸やいくつかの界面活性剤は優れた吸収促進剤であった。今回、蛋白分解酵素阻害剤または脂肪酸、界面活性剤をラットに経肺投与後、最終時点で解剖し、肺の観察を行ったが、少なくとも肉眼的には浮腫や変色など、肺組織に明らかな変化は見られなかった。しかし、いくつかの吸収促進剤は投与量によって刺激性などの障害が出ることも考えられ、肺胞粘膜へ

の毒性学的影響を病理的に十分検討する必要がある。

なお、今回の経肺投与実験にあたり、いくつかの予備検討を行っている（データは省略）。まず、カルシトニン単独投与時に、蛋白分解酵素または脂肪酸、界面活性剤を皮下投与し、カルシトニンの生物学的活性が変化しないことを確認している。また、カルシトニンに近い分子量をもつFITC-デキストラン（分子量4,000）を蛋白分解酵素阻害剤と一緒に経肺投与し、デキストランの残存率を調べた。その結果、蛋白分解酵素阻害剤が吸収部位の薬物透過性を促進しないことを確認した。

以上、サケカルシトニンの経肺吸収は、他粘膜投与経路に比べても、さらなる検討を進めるだけのポテンシーを持っていることが示された。しかし、経肺吸収では、代謝バリアーと透過バリアーの両因子が協力的に働き、吸収の障害になっていることが明らかとなり、高い吸収率を期待するには、これら両バリアーの克服が必要となる。

## 第2章 ヒト肺胞由来 A549細胞の培養単層におけるペプチド・蛋白の透過<sup>21)</sup>

### 序論

第1章で述べたように、経肺吸収でも他粘膜吸収と同様、ペプチド・蛋白に対し透過バリアーと代謝バリアーが存在する。透過バリアーの研究は、吸収部位での薬物の透過経路を知る上で大変重要であり、製剤の吸収を改善するのに有用な知見が得られる。最近、Fujita<sup>22)</sup>とYamahara<sup>23)</sup>は、肺胞細胞の*in vitro*培養系で肺胞上皮での薬物吸収を測定する系を確立した。前者は、ヒト肺アデノカルシノーマA549細胞を用いてデキストランの、後者はラット初代培養細胞を用いてインスリンの透過について報告した。こうした*in vitro*の評価系は、薬物の肺吸収のメカニズムの解析、及び製剤処方スクリーニングの有用な手段となりうると考えられる。本章では、II型肺胞細胞に類似しているとされるA549細胞<sup>24)</sup>を用いた*in vitro*測定系における水溶性高分子である各種ペプチド・蛋白、そしてデキストランの透過性と透過機序について検討した。

### 材料と方法

#### 薬物

薬物の略号と供給元は以下の通りである。ヒトブラジキニン；BK（ペプチド研究所）、サケカルシトニン；カルシトニン（バツケム）、組換え型ヒト上皮成長因子；EGF（ジェンザイム）、ヒトウロキナーゼ；UK（プロトジェン AG）、ヒトファクターXIII；FXIII（ベーリングベルケ）、FITC標識 ヒト イムノグロブリン G；FITC-IgG（カッペルオルガノテクニカ）、組換え型ヒトインターロイキン2；IL-2、リコンビナントヒト型インターロイキン6；IL-6、組換え型ヒトインターロイキン8；IL-8（アマシャム）、FITC標識 ヒトトランスフェリン；FITC-TF、FITC標識ヒトアルブミン；FITC-HSA（インターセルテクノロジ）、組換え型ヒト腫瘍成長因子  $\beta$ -2；TGF- $\beta$ -2（アーストラルバイオロジカル）、組換え型ヒトインターロイキン8 レセプター；IL-6R、組換え型ヒト血小板由来成長因子；PDGF（R&D システムズ）、FITC標識デキストラン；FITC-デキストラン、脂肪酸フリーウシ血清アルブミン；BSA（シグマ）。

#### 測定方法

FITC標識物は、蛍光分光光度計を用いて定量した。その他のアッセイには、次の定量

キットを用いた。

BK; マーキット-A ブラジキニン (大日本製薬)、UK; Tint Elize uPA (バイオプール AB)、EGF、IL-2、IL-6、hIL-8、hTGF- $\beta$ -2; Biotrak (アマシャム)、IL-6R、PDGF; Quantikine (R&D システムズ)、FXIII; Iatron-FL FXIII (ヤトロン)。但し、カルシトニン、マウス抗sCTモノクローナル抗体 (帝国製薬)、ウサギ抗sCT 抗体 (UCb バイオプロダクツ)、精製ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG (キルケガード・ペリー ラボラトリーズ) を用いたELISAにより測定した。

## 細胞培養

ヒト肺アデノカルシノーマ由来A549細胞株は理研細胞バンクより分与していただいた。培地は、Dulbecco's modified Eagle:Ham F-12 (1:1)/シグマに10%ウシ胎児血清 /Gibcoを添加して使用した。培養中の継代は1週間に1回とし、継代数88から94で、実験に供した。

## 透過実験

A549細胞を用いた透過実験は、Fujita ら<sup>22)</sup>の方法に準じて行ったが、透過膜には、コースター社製のトランスウエル (ポリカーボネート膜、直径24mm、孔径 3 $\mu$ m) ではなく、培養細胞の光学的観察が可能な同社製トランスウエルコラーゲン (膜直径; 12mm、孔径; 0.4 $\mu$ m) を使用した。トリプシン・EDTA処理で調製したA549 細胞懸濁液を、コラーゲン膜上に2~4 $\times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> まき、加湿、5% CO<sub>2</sub>、95%Air、37℃で細胞を培養し、6日後に透過実験に使用した。培地は2日おきに交換した。培養4日後には完全なconfluentな状態を呈し、細胞単層の電気的抵抗値 (100 $\mu$ A of pulse current at 50Hz、10msec duration)は6日目で、764 $\pm$ 29 $\Omega$  (N=10)であった。

コラーゲン膜上の細胞単層は0.1%BSA 含有アール平衡化塩類溶液で2回洗浄し、同液で5% CO<sub>2</sub>-95%Air、37℃下で1時間平衡化させた。ただし、FITC-HSAでは、BSA非添加の平衡化塩類溶液を用いた。透過実験における平衡化塩類溶液の容量は、上室 (apical side; A) で0.5ml、下室 (basolateral side; B) で1.5mlとした。ドナー側 (上室もしくは下室) に希望最終濃度になるよう薬液を添加し、加湿、5% CO<sub>2</sub>、95%Air、37℃また4℃で15分、30分、60分、120分、180分後にレシーバーに移行した薬物量を測定した。37℃でのA $\rightarrow$ B)とB $\rightarrow$ Aへの薬物移行、さらに4℃でのA $\rightarrow$ B移行を検討した。なお、対照としては、コラーゲン膜のみの透過係数を求めた。各薬物の見かけ透過係数 (Papp) を以下の方式で算出した。



$$dJ/dt = -P_{app}A \cdot (C_d - C_r) \quad (1)$$

$$C_r = \frac{C_0 V_d}{(V_d + V_r)} \cdot \left[ 1 - \exp \left\{ -P_{app} \left( \frac{1}{V_d} + \frac{1}{V_r} \right) t \right\} \right] \quad (2)$$

ここで、

$dJ$ ; 溶質拡散流束の変化

$P_{app}$ ; 見かけの透過係数

$A$ ; 透過面積

$dC$ ; 上室と下室の溶質濃度差

$C_0$ ; ドナー側の初期濃度

$C_r$ ; レシーバー側の溶質濃度

$V_d$ ; ドナー側液量  $V_r$ ; レシーバー側液量

## 薬物の安定性

試験薬物の安定性を調べるため、透過実験と同様にA549細胞単層が形成されたトランスウエルコラーゲンの上室と下室に同一濃度の薬液を入れ、加湿、5% CO<sub>2</sub>、95% Air、37℃で3時間静置後、両チャンバー中の薬物濃度を求めた。対照としては、コラーゲン膜のみのトランスウエルコラーゲンを用いて同様な実験を実施した。

## 結果と考察

### 各薬物の透過係数

代表的なペプチド・蛋白の例として、BK、カルシトニン、IL-2、PDGF、UK、FXIIIについて、透過率の経時的变化をFigure 7に表した。各薬物から得た実測値に最適な透過係数を理論式(2)から求め、ペプチド・蛋白についてTable 1に、デキストランについてはTable 2にまとめた。コンピューターを用いたLevenberg-Marquardtアルゴリズムにもとづくカーブフィッティングにより、各透過係数を算出した。その結果、各薬物での近似式の相関係数は0.980以上と、良好な近似が得られた。

37℃で調べた薬物の透過係数 $P_{A \rightarrow B}$ は $10^{-5} \sim 10^{-7}$  (cm/sec)であり、FITC-デキストランのそれは、Fujitaら<sup>22</sup>が報告した値に近い。しかし、他の薬物の*in vivo*もしくは*in situ*での肺透過係数（クリアランス率から推定した数値も含める）に比べ、やや大きかった<sup>25-27)</sup>。おそらく、Byron & Philips<sup>28)</sup>が指摘しているように、生体での透過係数を算出するのに必要な透過面積、肺胞液（alveolar fluid）量、溶質交換液量の値が求めにくいため、*in vitro*培養細胞系での透過係数とは、一致しないのであろう。また、生体内で肺胞上皮は、肺胞液で覆われており、その粘性は薬物の吸収に影響する可能性がある。A549細胞を用いた評価系では、その影響は再現できないため、*in vivo*、*in situ*の結果と異なるのかもしれない。

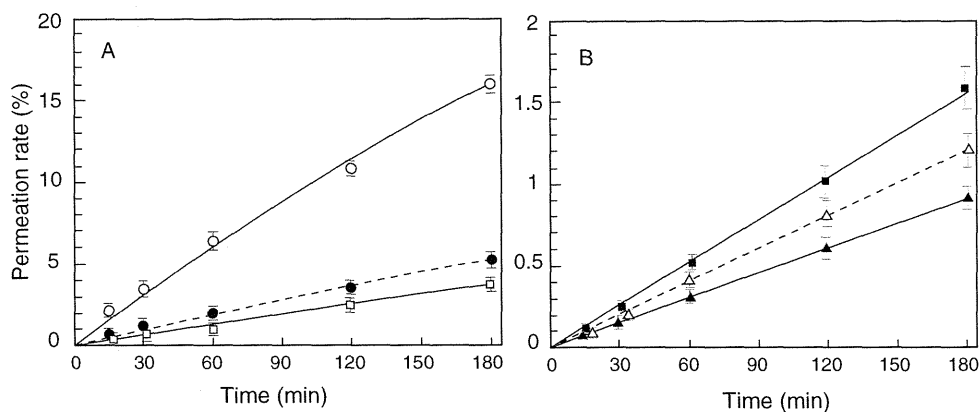


Figure 7. Permeation of peptides and proteins in A549 cell monolayers from apical side at 37°C. A: Bradykinin at 100nM (○), calcitonin at 100nM (●), IL-2 at 10nM (□). B: PDGF at 1nM (■), urokinase at 10nM (△), Factor XIII at 1μM (▲). Each point represents the mean±SE (n=4).

Table 1 Permeability coefficient for peptides and proteins in A549 cell monolayers

Compound (m.w.)	Direction of transport	Concentration	Permeability coefficient ( $10^{-6}$ cm/sec) <sup>a)</sup>	
			37°C	4°C
Bradykinin (1,000)	A→B	100 nM	$8.4 \pm 0.4^c)$	$8.0 \pm 0.5$
		1 $\mu$ M	$8.0 \pm 0.3$	NT <sup>b)</sup>
	B→A	100 nM	$7.5 \pm 0.6$	NT
Calcitonin (3,400)	A→B	100 nM	$2.5 \pm 0.2^c)$	$2.4 \pm 0.2$
		1 $\mu$ M	$2.6 \pm 0.1$	NT
		10 $\mu$ M	$2.5 \pm 0.2$	NT
	B→A	100 nM	$1.9 \pm 0.04$	NT
EGF (6,000)	A→B	10 nM	$1.3 \pm 0.09^c)$	$1.3 \pm 0.1$
		100 nM	$1.4 \pm 0.09$	NT
	B→A	10 nM	$0.5 \pm 0.06$	NT
IL-8 (8,500)	A→B	1 nM	$2.2 \pm 0.2^c)$	$2.2 \pm 0.3$
		10 nM	$2.3 \pm 0.2$	NT
	B→A	1 nM	$0.8 \pm 0.06$	NT
IL-2 (14,700)	A→B	10 nM	$1.7 \pm 0.09^c)$	$1.8 \pm 0.2$
		100 nM	$1.8 \pm 0.09$	NT
	B→A	10 nM	$1.4 \pm 0.05$	NT
IL-6 (20,000)	A→B	1 nM	$1.1 \pm 0.07^c)$	$0.9 \pm 0.1$
		10 nM	$1.0 \pm 0.09$	NT
	B→A	1 nM	$0.65 \pm 0.02$	NT
TGF- $\beta$ -2 (25,000)	A→B	1 nM	$0.64 \pm 0.05^c)$	$0.60 \pm 0.0$
		10 nM	$0.65 \pm 0.06$	NT
	B→A	1 nM	$0.67 \pm 0.08$	NT
PDGF (27,000)	A→B	1 nM	$0.73 \pm 0.07^c)$	$0.84 \pm 0.0$
		10 nM	$0.73 \pm 0.07$	NT
	B→A	1 nM	$0.65 \pm 0.05$	NT
IL-6R (34,000)	A→B	1 nM	$0.59 \pm 0.04^c)$	$0.57 \pm 0.0$
		10 nM	$0.61 \pm 0.04$	NT
	B→A	1 nM	$0.54 \pm 0.05$	NT
Urokinase (54,000)	A→B	10 nM	$0.57 \pm 0.05^c)$	$0.54 \pm 0.0$
		100 nM	$0.55 \pm 0.05$	NT
	B→A	100 nM	$0.38 \pm 0.03$	NT
FITC-HSA (64,000)	A→B	0.5 $\mu$ M	$1.0 \pm 0.09^c)$	$0.99 \pm 0.1$
		5 $\mu$ M	$1.1 \pm 0.05$	NT
		0.5 $\mu$ M <sup>d)</sup>	$1.1 \pm 0.1$	NT
	B→A	5 $\mu$ M	$0.74 \pm 0.03$	NT
FITC-TF (80,000)	A→B	5 $\mu$ M	$0.97 \pm 0.08^c)$	$0.91 \pm 0.0$
	B→A	5 $\mu$ M	$0.39 \pm 0.03$	NT
FXIII (83,000)	A→B	1 $\mu$ M	$0.42 \pm 0.04^c)$	$0.39 \pm 0.0$
FITC-IgG (150,000)	A→B	1 $\mu$ M	$0.30 \pm 0.02^c)$	$0.29 \pm 0.0$
		1 $\mu$ M <sup>d)</sup>	$0.30 \pm 0.03$	NT
	B→A	1 $\mu$ M	$0.28 \pm 0.04$	NT

a) Mean  $\pm$  S.E. (N=4), b) Not tested, c) These values were used in Fig. 2,

d) Non-labeled HSA and IgG were simultaneously added at 500  $\mu$ M and 1 mM, respectively.

Table 2. Permeability coefficient for FITC-dextrans in A549 cell monolayers

Compound (m.w.)	Direction of transport	Concentration	Permeability coefficient ( $10^{-6}$ cm/sec) <sup>a)</sup>	
			37°C	4°C
F-4 (4,400)	A→B	1 $\mu$ M	3.4 $\pm$ 0.2 <sup>c)</sup>	3.3 $\pm$ 0.3
		10 $\mu$ M	3.4 $\pm$ 0.3	NT <sup>b)</sup>
	B→A	1 $\mu$ M	2.8 $\pm$ 0.2	NT
F-10 (9,400)	A→B	1 $\mu$ M	2.2 $\pm$ 0.02 <sup>c)</sup>	1.4 $\pm$ 0.1
		10 $\mu$ M	2.0 $\pm$ 0.04	NT
F-20 (19,600)	A→B	1 $\mu$ M	1.2 $\pm$ 0.1 <sup>c)</sup>	1.3 $\pm$ 0.1
		10 $\mu$ M	1.4 $\pm$ 0.06	NT
	B→A	1 $\mu$ M	0.84 $\pm$ 0.07	NT
F-40 (38,900)		1 $\mu$ M	0.75 $\pm$ 0.07 <sup>c)</sup>	0.73 $\pm$ 0.03
		10 $\mu$ M	0.71 $\pm$ 0.03	NT
F-70 (71,200)	A→B	1 $\mu$ M	0.61 $\pm$ 0.04 <sup>c)</sup>	0.59 $\pm$ 0.02
		10 $\mu$ M	0.60 $\pm$ 0.05	NT
	B→A	1 $\mu$ M	0.42 $\pm$ 0.02	NT
F-150 (147,800)	A→B	1 $\mu$ M	0.25 $\pm$ 0.03 <sup>c)</sup>	0.22 $\pm$ 0.02
		10 $\mu$ M	0.24 $\pm$ 0.05	NT
	B→A	10 nM	0.19 $\pm$ 0.05	NT

a) Mean $\pm$ S.E. (N=4)

b) Not tested

c) These values were used in Fig. 8.

Yamaharaら<sup>23)</sup>が報告したインスリンの透過係数は、分子量が近いにもかかわらずカルシトニンの透過係数より10倍以上も小さく、その差が何に起因するのか考察する必要がある。彼らによれば初代肺胞 II型単層細胞の抵抗は、2000 $\Omega$ 以上であり、A549細胞系での抵抗値よりも2～3倍も高く、tight junctionの強さの違いが、その理由の一つとしてあげられる。D.T. Thwaitesら<sup>29)</sup>の結果では、Caco-2などいくつかの培養細胞単層を用いた透過実験で、抵抗値が2倍ほど高くなると、Thyrotropin-releasing hormone (TRH) の透過率が、1/5～1/6になる。透過係数も同程度もしくはそれ以上変化すると推測される。Yamaharaら<sup>23)</sup>の用いている初代II型細胞系は、培養中にI型細胞に分化する。肺胞上皮では、細胞間tight junctionには、複数のタイプがあるとされ、I型-I型細胞間と、II型-II型細胞間では、tight junctionの性質が異なり、バリアーとしての強さに差があると思われる。両培養細胞の形態学的な違いを調べれば、透過性の差を説明できるかもしれない。

## 透過係数と分子量の相関

Figure 8に示すように、各薬物の分子量と37℃における透過係数 $P_{A \rightarrow B}$ は良好な逆相関を示した( $R=0.968$ )。経肺吸収において、薬物の分子量と透過係数が逆相関する傾向は、すでに*in vivo*、*in situ*の結果として報告されている<sup>28,30,31</sup>。しかし、*in vitro*でペプチド・蛋白の透過性における相関関係を調べたのは、本研究が初めてである。Effrosら<sup>31</sup>は、広範囲にわたり分子量の対数と肺クリアランスの対数間に負の相関が存在すると報告している。彼らの結果では、分子量1,000～10,000間でクリアランスが数十倍変化しており、今回の結果と同じ傾向を示している。また、分子量の変化に対する明確な透過性の閾値が認められなかった点も一致している。A549細胞単層の透過係数と*in vivo*での肺吸収の相関性は今後の重要な検討課題として残っている。

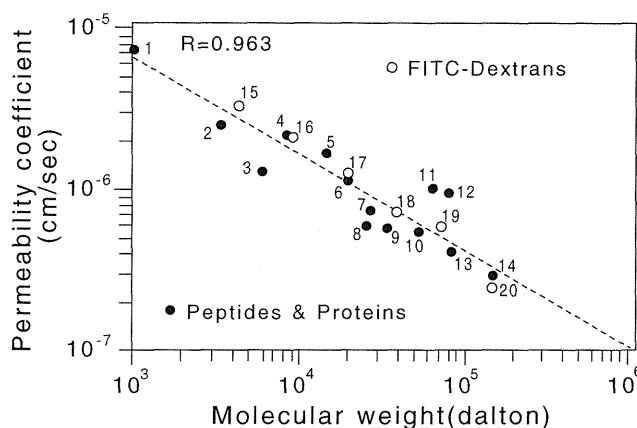


Figure 8. Correlation between permeability coefficient and molecular weight of peptides and proteins. 1;bradykinin, 2;calcitonin, 3;EGF, 4;IL-8, 5;IL-2, 6;IL-6, 7;TGF- $\beta$ -2, 8;PDGF, 9;IL-6R, 10;urokinase, 11;albumin, 12;transferrin, 13;FactorXIII, 14;IgG, 15~20;dextrans.

## 透過機序

ドナー側の濃度を10倍差を変えたとき、各薬物の透過係数はほとんど変わらず、37℃と4℃での透過係数にも明らかな差は認められなかった (Table 1、2)。また、FITC-BSA、FITC-IgGの透過係数は、高濃度の非標識体共存下でも変わらなかった。さらに、ペプチド・蛋白の透過にラグタイムが見られなかったことも合わせ、今回調べたペプチド・蛋白は、デキストランと同様、主として受動的拡散で上皮単層の細胞間隙を通過していると推察された。Figure 8に示した各薬物の分子量と透過係数の逆相関関係が成立したことからこの考えは支持される<sup>32</sup>。Pattonら<sup>5,12</sup>は、分子量が22kD以下のペプチドでは、*in vivo*経肺吸収率は分子量に左右されず、肺胞上皮でのトランスサイトosisで吸収されると考察している。しかし、彼らは、ペプチドや蛋白が代謝されることによって分子量に依存しない吸収を示す可能性を考慮していない。ただ、A549が生体内でのトランスサイトosis能を保持している

かは今後調べる必要がある。今回適用した薬物濃度よりもさらに低い初期濃度で透過性を検討すれば、トランスサイトosisなどによる能動輸送が観察される可能性はある。

## 安定性

各被験薬物の透過実験系における安定性を調べた結果、すべての薬物について細胞単層と3時間接触しても、95%以上が残存し、安定であった。A549細胞のペプチダーゼ・プロテアーゼ活性が透過量に影響を与えるほど強くなく、生体内での代謝バリアーとして機能していないと思われた。初代肺胞II型細胞を用いた系では、インスリンが反応中に分解することが報告されており<sup>23)</sup>、A549細胞との相違が認められる。この代謝バリアーの有無の違いが両系における透過係数の大きな差につながっている可能性もある。

## 透過の方向性

EGF、IL-8、IL-6、UK、FITC-TF、FXIIIでは、 $P_{A \rightarrow B}$ が $P_{B \rightarrow A}$ の約2倍から3倍と差が見られた。しかし他の薬物では、両透過係数値に差がなく、分子量との関連も見られなかった。Yamaharaら<sup>23)</sup>の結果では、インスリンの $P_{A \rightarrow B} / P_{B \rightarrow A}$ は0.15nMにおいて約2であり、14から75 $\mu$ Mでは、差がなかった。こうした薬物透過の方向性の違いに関しては、他研究でも詳しい知見はなく、今回の結果からA549細胞単層が透過性方向に選択性を有しているか否か、明確な結論、考察を導き出せなかった。

以上、サケカルシトニンなど水溶性高分子のペプチド・蛋白は、A549肺胞細胞単層の細胞間隙を受動的拡散により透過すると考えられる。先に述べたように経肺吸収において、*in vivo*、*in situ*で薬物の分子量と透過係数が逆相関することから、生体の肺上皮でもペプチド・蛋白は細胞間隙を通過する受動的拡散によって透過・吸収されている可能性が示唆された。

### 第3章 ペプチド・蛋白の経肺吸収に及ぼす決定因子（透過バリアーと代謝バリアー）<sup>33)</sup>

#### 序論

第1、2章で明らかのようにペプチド・蛋白の粘膜吸収を向上させるには、透過バリアーと代謝バリアーの両者を克服する必要があるが、どちらがペプチド・蛋白の吸収により大きく影響するのか分かっていない。そこで、経肺吸収における決定因子を解明するため、インスリン、カルシトニン、上皮成長因子、インターフェロン- $\gamma$ 、エリスロポエチン、インターフェロン-1レセプターのラットにおける*in vivo*経肺吸収と肺ホモジェネート中での安定性について検討した。

#### 材料と方法

##### 薬物

サケカルシトニン；カルシトニン（バッケム）、組換え型ヒトインスリン；インスリン（ノボノルディック）、組換え型上皮成長因子；EGF（R&D システムズ）、組換え型ヒトインターフェロン- $\gamma$ -1a；IFN- $\gamma$ （塩野義製薬）、組み換え型ヒトエリスロポエチン；EPO（中外製薬）、組み換え型ヒトインターロイキン 1レセプター；IL-1R（ヘキストジャパン）。

##### 薬物測定方法

薬物の定量には以下の酵素免疫法測定キットを用いた。インスリン/EIA インスリン II（ベーリングーマンハイム）、EGF/Biotrak（アマシャム）、IFN- $\gamma$ /インターフェロンガンマ ELISA（エンドジェン）、EPO/エリスロポエチンキット（ジェンザイム）、IL-1R/社内用キット（ベーリングベルケ）。カルシトニンは、第2章で用いた市販の抗体を組み合わせたELISAにて測定した。

##### 動物実験

経肺投与は、第1章と同様に、麻酔処置をしたラットの気管内にカニュレーションし、100 $\mu$ lの薬液を肺内へ注入した。静脈内投与では頸静脈より注射した。投与後、尾静脈より採血し、血漿中の薬物濃度を測定した。血漿中濃度下面積AUCを台形公式により算出し、経肺吸収のバイオアベイラビリティ（B.A. (%)）、すなわち、 $AUC_{i.t.}/AUC_{i.v.}$  (%)を求めた。 $T_{max}$ は、実測値を用いた。

## 肺ホモジェネート中における安定性

肺ホモジェネートを調整するために、6匹のラット肺を摘出し、気管支及び、肉眼で確認できる細気管支を取り除いた。肺組織1gあたり冷却した5mlの0.2M サッカロース含有0.1M Tris-HCl buffer (pH7.4)を加え、ポリトロンを用いて、30秒間ホモジェネートした。1,000xgで15分間遠心し、細胞残滓を除去した。この上清を9,000xgで30分間遠心し、上清を肺ホモジェネートとして、酵素反応に用いた。上記調製処理は、全て4℃にて行った。

酵素反応では、薬物を0.1M Tris-HCl buffer (pH7.4)で使用濃度に調製し、基質溶液とした。100 $\mu$ lの基質溶液を37℃で15分間温めた後、肺ホモジェネート液25 $\mu$ lを添加し、反応を開始した。反応1、2、3時間後に反応容器を氷上で急速に冷却し、同時に予め冷却した0.1M Tris-HCl buffer (pH7.4)の75 $\mu$ lを添加することにより反応を停止した。その後の操作は、氷上にて行った。すなわち、残存薬物濃度を求めるため、反応を停止した反応液を適宜、冷却した0.1%BSAを含む0.1M Tris-HCl buffer (pH7.4)で希釈し、アッセイキットにて測定した。この時、薬物と1次抗体、2次抗体との反応は、4℃、2～4時間に変更した（IL-1Rのアッセイでは、1次抗体との反応時間を18時間とした）。このアッセイでは、対照として、予め冷却した基質に肺ホモジェネート液を加えたものを用いた。また、基質とした各薬物は酵素非添加では、37℃、4時間まで免疫反応性に変化がないことを確認している。



## 結果

### ラットにおける経肺吸収

カルシトニン、インスリン、EGF、IFN- $\gamma$ 、EPO、IL-1Rを経肺投与した時のB.A.(%)、 $T_{\max}$ 、消失相の半減期 $T_{1/2}$ をTable 3にまとめた。また、血漿中薬物濃度推移をFigure 9に示した。 $T_{\max}$ 、 $T_{1/2}$ は分子量に依存して増大する傾向にあるが、B.A.(%)と分子量の相関性はなかった。

Table 3. Pharmacokinetics parameters of peptides and proteins following pulmonary administration to rats

Peptides & proteins	MW(kD)	Dose /rat	BA <sub>i.t./i.v.</sub> (%)	$T_{\max}$ (hr)	$T_{1/2}$ (hr)
Calcitonin	3.4	20 $\mu$ g	18.0	0.25	0.52
Insulin	5.8	3 U	9.1	0.25	0.5
EGF	6	10 $\mu$ g	59.1	1	2.5
IFN- $\gamma$	17.5	$3 \times 10^5$ U	36.8	5	3.3
EPO	30	600 U	17.8	5	7.3
IL 1-receptor	60	10 $\mu$ g	6.8	12	10

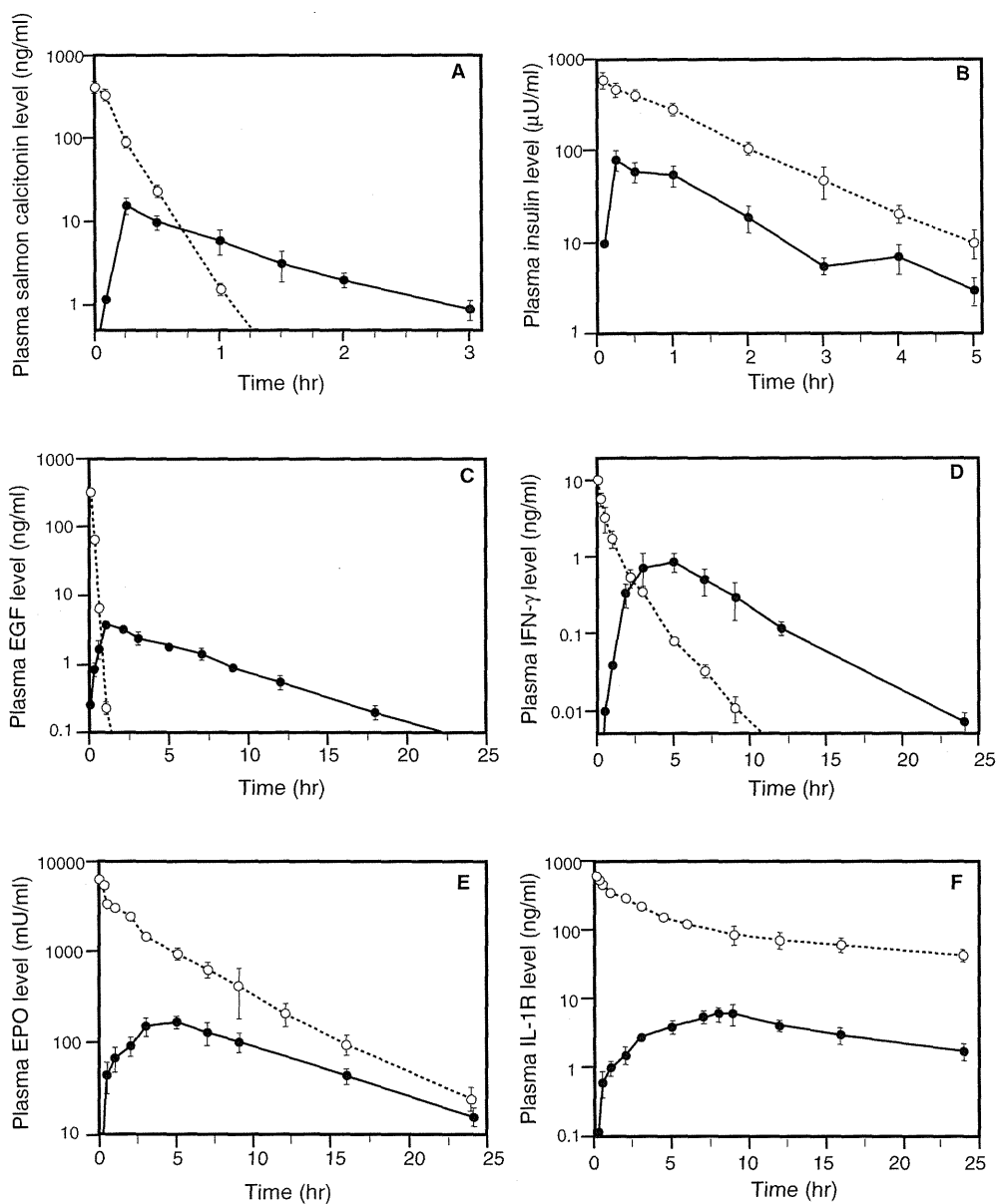


Figure 9. Plasma profiles of peptides and proteins following intratracheal (●) and intravenous (○) administration to rats: calcitonin (A), insulin (B), EGF (C), IFN- $\gamma$  (D), EPO (E), IL-1R (F). Values show mean $\pm$ SE (n=4~6). Refer to Table 3 for the dose and pharmacokinetics parameters.

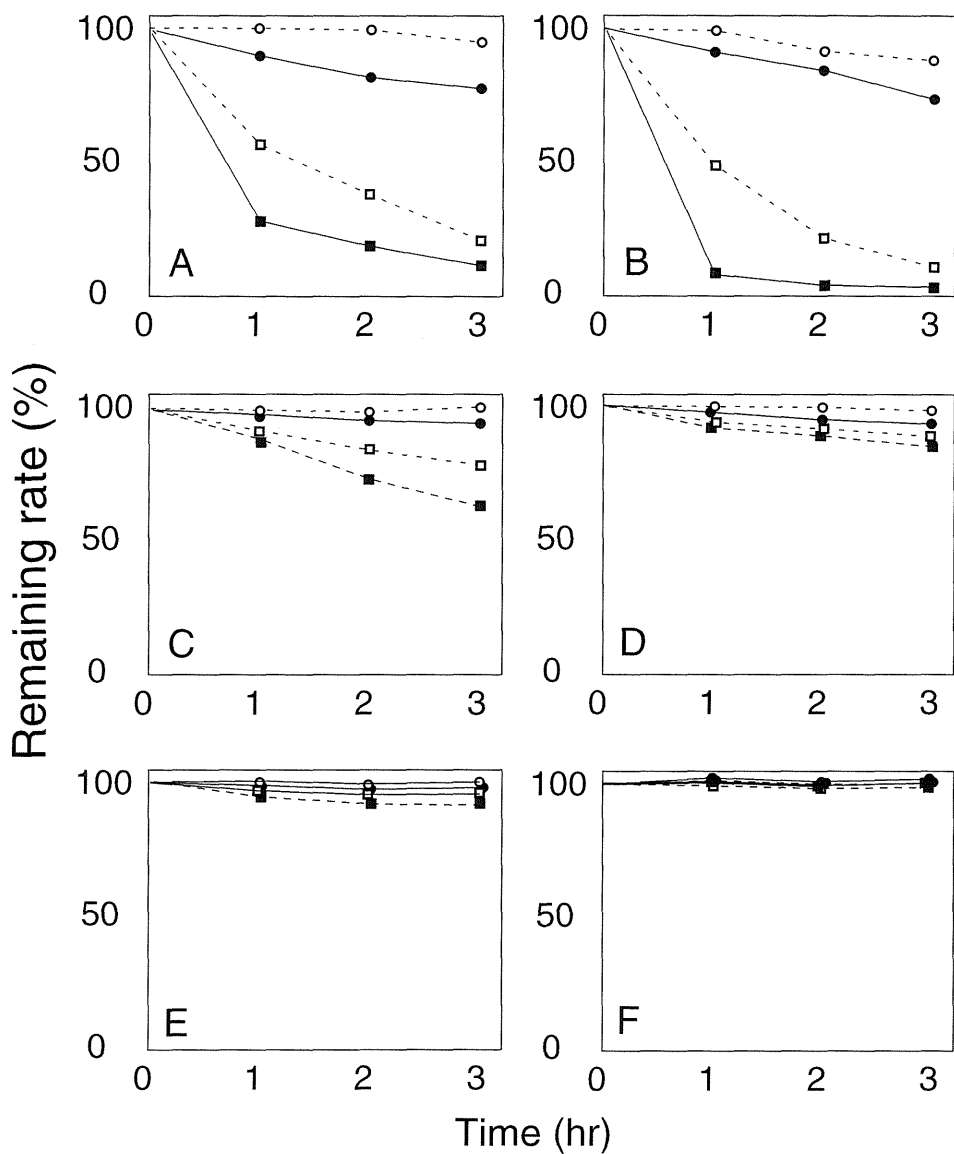


Figure 10. In vitro degradation of peptides and proteins in the rat lung homogenate. The concentration of substrates (○, ●, □, ■) are 500, 50, 5, 0.5  $\mu\text{M}$  of calcitonin (A), 500, 50, 5 and 0.5  $\mu\text{M}$  of insulin (B), 100, 10, 1 and 0.1  $\mu\text{M}$  of EGF (C), 10, 2, 0.2 and 0.02  $\mu\text{M}$  of IFN- $\gamma$  (D), 20, 2, 0.2 and 0.02  $\mu\text{M}$  of EPO (E) and 20, 2, 0.2 and 0.02  $\mu\text{M}$  of IL-1R (F), respectively. Values show means  $\pm$  SE for four experiments.

## 肺ホモジェネート中における安定性

Figure 10に示すように、カルシトニンとインスリンは、肺ホモジェネートとの反応で分解されやすく、特に*in vivo*投与に用いた薬液の濃度以下で顕著であった。EGFの分解は比較的穏和であった。IFN- $\gamma$ はわずかなに分解された。EPO、IL-1Rは極めて安定であった。

## 考察

経肺投与において水溶性薬物デキストランの吸収率は、薬物の分子量と逆相関する<sup>34)</sup>。また、Nivenら<sup>35)</sup>は、酵素による代謝を受けないペプチドを用いた実験で、経肺投与での吸収率が、分子量に依存することを報告している。経鼻吸収でも同様な関係が報告されている<sup>36)</sup>。ペプチドや蛋白のような非脂溶性薬物では、粘膜上皮での主たる透過経路は細胞間隙と考えられ、そこでの透過バリアーは、薬物の電荷や、脂溶性ではなく、分子サイズ（分子量）に大きく依存している。そこで、今回得られた結果と文献データをもとに、分子量と経肺吸収率の相関を調べてみると（Figure 11）、B.A. (%)と分子量間の相関係数は低く（ $R=0.28$ ）、特に分子量が1万以下の、いわゆるペプチドに属する薬物で相関性が悪かった。これと対照的に、分子量1万以上の蛋白系薬物では、相関性が極めて良好であった（ $R=0.802$ ）。この理由として、ペプチド系薬物では、代謝バリアーが強く影響するためと考えられた。逆に、デキストランのような代謝を受けない薬物では、透過バリアーのみが影響するため、薬物の分子量と吸収率が相関すると考えられる<sup>39)</sup>。今回の実験でも明らかに、インスリン、カルシトニンは、肺ホモジェネートにより分解されやすい。用いた酵素量は、肺全体のごく一部であるため、実際の肺内では、より多く分解される可能性がある。確かに、インスリン、カルシトニンは*in vivo*経肺吸収において<sup>13,15,37)</sup>、dDAVPは経鼻投与において<sup>38)</sup>、投与部位の酵素により分解される。そのため、ペプチド系薬物では、比較的小さな分子量から期待されるほど高いB.A. (%)が得られないと推察される。それらに対して、LHRHアナログは、アミノ酸の修飾により酵素への抵抗性が高まっており、B.A.

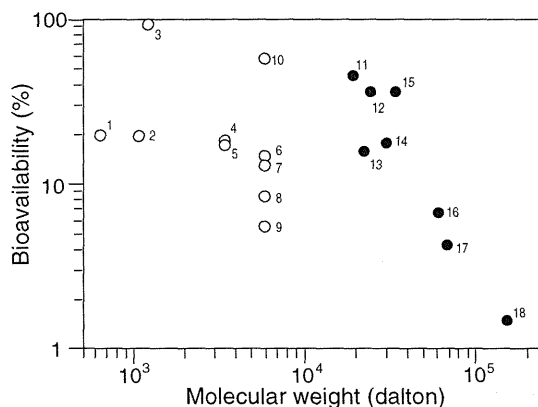


Fig. 11. Correlation between the pulmonary bioavailability and the molecular weight of peptides and proteins. 1;SK&F 1060760<sup>40\*)</sup>,2;dDAVP<sup>41)</sup>,3;LH-RH analog<sup>39)</sup>,4;calcitonin<sup>\*)</sup>,5;calcitonin<sup>12)</sup>,6;insulin<sup>42)</sup>,7;insulin<sup>6)</sup>,8;insulin<sup>\*)</sup>,9;insulin<sup>43)</sup>,10;EGF<sup>\*)</sup>,11;G-CSF<sup>44)</sup>,12;GH<sup>45)</sup>,13;GH<sup>46)</sup>,14;EPO<sup>\*)</sup>,15;IFN- $\gamma$ <sup>\*)</sup>,16;IL-1R<sup>\*)</sup>,17;BSA<sup>41)</sup>,18;IgG<sup>41)</sup>. Each data was obtained from references <sup>\*)</sup> or from the present study <sup>\*\*)</sup>.

(%)が95%と高値である<sup>39)</sup>。EGFは、インスリンと近い分子量ながら、インスリンよりはるかに吸収がよい。これは、インスリンより、酵素への安定性が高いためと考えられる。第1章で触れたように、肺ホモジェネートを用いた結果をそのまま*in vivo*での代謝に短絡的に結びつけるのは危険であるが、ペプチド系薬物と比較し、蛋白系薬物は代謝バリアーの影響を受けにくいと推察される。

以上、経肺吸収の決定因子を透過バリアーと代謝バリアーの2つに絞ったとき、ペプチド系薬物では代謝バリアーが、蛋白系薬物では、透過バリアーがより強く影響することを明らかにした。全身吸収を目的とした経肺投与における吸収率の最適化には、ペプチド系薬物では、酵素への抵抗性を高めるためのアミノ酸置換等の修飾、蛋白系薬物では、細胞間隙経路での透過性促進に有効で、かつ安全な吸収促進剤の利用が効果的であろう。

## 第4章 ヒト肺胞由来 A549細胞におけるオレイン酸の吸収促進作用とそのメカニズム<sup>47)</sup>

### 序論

第1章～第3章で示したように、分子量（分子サイズ）に依存した透過バリアーが肺胞上皮に存在し、ペプチド・蛋白、特に蛋白の経肺吸収を向上させるには透過バリアーの克服が必要である。オレイン酸はエアゾール吸入剤の分散剤・滑沢剤として医薬品に添加されており、しかも第1章で示したように優れた吸収促進作用を有している。オレイン酸を吸収促進剤として利用するには、その作用機序を解明することが製剤化する上で重要と考え、本章では、オレイン酸の作用機序を詳しく検討した。特に、Wangら<sup>48)</sup>が最近報告したオレイン酸の作用、すなわち肺胞上皮細胞の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇に着目し、第2章で用いたA549細胞単層におけるオレイン酸の吸収促進作用と細胞内Ca<sup>2+</sup>との関係から調べた。また、他の吸収促進剤ジメチル-β-D-シクロデキストリン (DMβCD) とタウロコール酸の作用機序との違いについても考察した。

### 材料と方法

#### 試薬と調製

薬物は以下のように調製した。DMβCD、タウロコール酸、ニフェジピン、ベラパミル、Fura-2AM（和光純薬）、H-89<sup>a)</sup>、KN-62<sup>b)</sup>、HDBA<sup>c)</sup>、U-73122<sup>d)</sup>、RHC 80267<sup>e)</sup>（バイオモルリサーチラボラトリー）、R59949<sup>f)</sup>（ヤンセン）は使用時DMSO（ジメチルスルフォキシド）で溶解した。Compound 48/80、ML-9<sup>g)</sup>、H-7<sup>h)</sup>、W-7<sup>i)</sup>、TMB-8<sup>j)</sup>（バイオモルリサーチラボラトリー）は精製水で溶解した。DMSOは、どの薬液でも最終濃度が2%を越えないよう調整し、DMSO単独では無作用であることを確認した。これ以外の試薬は、第1章から第3章までに使用したものと同一である。

- a) N-[2-(p-ブロモシナニールアミノ)エチル]-5-イソキノリンスルフォナミド
- b) KN-62(1-(N, O-ビス-1,5-イソキノリンスルフォニール)-N-メチル-L-チロシル-4-フェニルピペラジン
- c) 2-ヒドロキシ-5-(2,5-ジヒドロキシベンジルアミノ)benzoic acid
- d) 1-6-((17 β-3-メトイエステル-1,3,5(10)-トリエン-17-yl)アミノヘキシル)-1H-ピロール-2,5-ジオン
- e) 1,6-ビス(シクロヘキシルオキシミノカルボニルアミノ)ヘキサン
- f) 3-[2-[4-[ビス(4-フルオロフェニル)メチレン]-1-ピペジニール]エチル]-2,3-ジヒドロ-2-チオキソ-4(1H)-キナゾリン
- g) 1-(5-クロロナフタレン-1-スルフォニル)1H-ヘキサヒドロ-1,4-ジアゼピン HCl
- h) 1-(5-イソキノリンスルフォニル)-2-メチルピペラジン
- i) N-(6-アミノヘキシル)-5-クロロ-1-ナフタレン-スルフォナミド HCl
- j) 8-(N, N-ジエチルアミド)-オクチル-3,4,5-トリメトキシベンゾエート

## A549 細胞を用いた透過性実験

第2章に述べた方法に従って、FITC-デキストランの透過性を測定した。ドナー側（上室）に、FITC-デキストランの最終濃度が $1\mu\text{M}$ になるよう添加し、レシーバー溶液より $10\mu\text{l}$ を経時的にサンプリングした。蛍光分光光度計により透過したFITC-デキストラン量を測定した。培養、透過実験は、すべて加湿、5%  $\text{CO}_2$ 、95% 37℃にて行った。各種カルシウム関連阻害剤の効果を検討する場合には、阻害剤をドナー側とレシーバー側の両方に同濃度にて添加し、3分間予備反応を行った後に、オレイン酸とFITC-デキストランを同時に添加した。

## Fura-2を用いた細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の測定<sup>48)</sup>

Fura-2AMを0.1% BSA含有したアール平衡化塩類溶液に最終濃度が $10\mu\text{M}$ になるよう懸濁した。A549細胞単層に添加後、90分間95%Air-5% $\text{CO}_2$ 、37℃にて静置し、細胞内にFura-2AMを取り込ませた。細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 測定システムは、浜松フォトニックスの画像処理測定システム(ARGUS-50/CA)を用いた。励起波長340nm/380nmを利用するレシオ法により測定した。蛍光顕微鏡で一視野あたり、Fura-2で均一に染まった細胞10個を選択し、薬物添加後の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ を10分間モニターした。細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 測定は37℃で行った。

## 結果

### 吸収促進剤の透過性に及ぼす影響

吸収促進剤（オレイン酸、DMBCD、タウロコール酸）添加後のFITC-デキストランの透過性の変化を調べた。吸収促進剤添加群では非添加群に比べ、透過量が経時的に増大した。オレイン酸2%ではやや透過量の増加率に減少が見られた(Figure 12)。

Figure 13に示したように、オレイン酸は、0.02%~2%において、添加濃度に依存した吸収促進作用を示し、2%添加では、2hr後に非添加時に比べ透過量が4倍増大した。一方、DMBCD及びタウロコール酸添加2時間後の透過率の変化を見ると、両者の作用も濃度依存的であったが、いずれも1~2%付近に閾値が存在した。

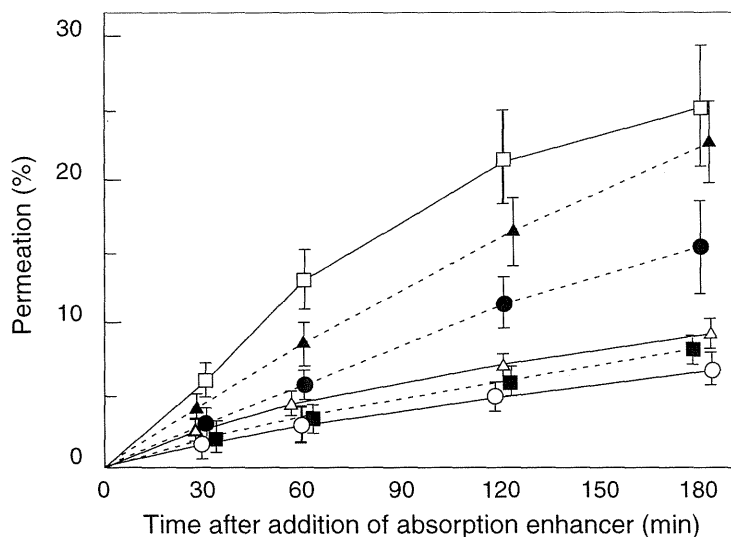


Figure 12. Effect of oleic acid on the transepithelial transport of FITC-dextran through A549 cell monolayers. Each point represents the mean $\pm$ SE (n=4). The concentration of oleic acid was 0%(○), 0.02%(■), 0.1%(△), 0.5%(●), 1%(▲) and 2%(□).

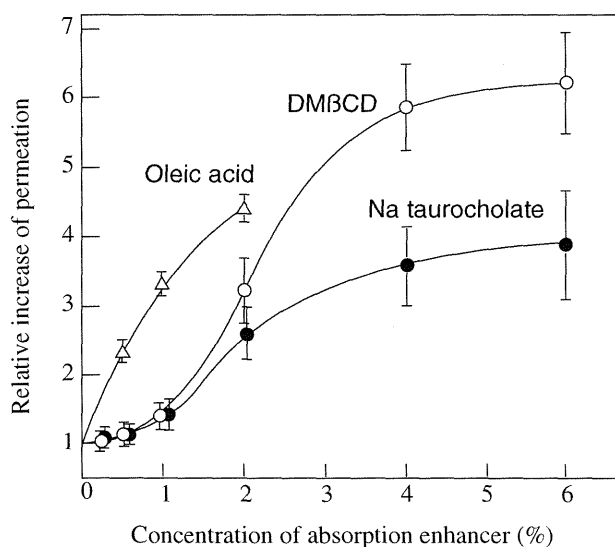


Figure 13. Effect of oleic acid, DMβCD and taurocholic acid on the transepithelial transport of FITC-dextran through A549 cell monolayers in 2hr incubation. The transported amount of dextran after 2hr in the absence of enhancers was designated as 1.0. Each point shows the mean $\pm$ SE of four experiments.



吸収促進剤の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に及ぼす影響

吸収促進剤添加後の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  レベルの変化をFigure 14に示した。0.1%、0.5%、1% オレイン酸添加後、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  は、濃度依存的に増加し、約2分後ピークに達し、その後すみやかに下降する一過性的変化を示した。1%添加濃度時で非添加時のベースレベルよりピーク値は、約40倍上昇した。一方、0.1%、1%、4%のDMBCD、タウロコール酸は吸収促進作用が認められた4%濃度においても、測定時間内では細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  への影響は見られなかった (Figure 14には、4%での変化のみを表示)。

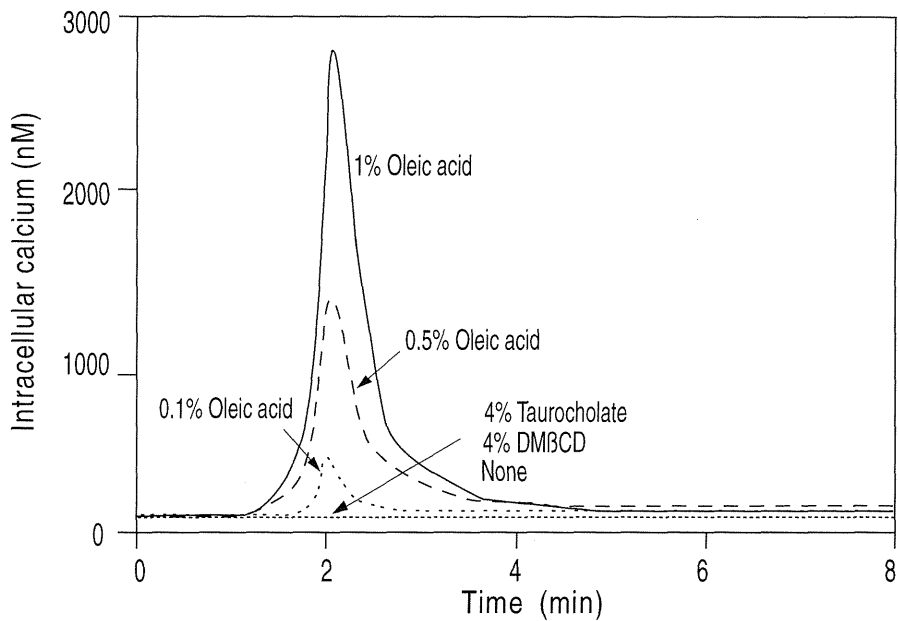


Figure 14. Effect of absorption enhancers on the intracellular calcium in A549 cell monolayers.

細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度のオレイン酸の効果に対する影響

細胞外液をオレイン酸添加 3 0 分前に  $\text{Ca}^{2+}$  フリーのアール平衡化塩類溶液に置き換え、1%オレイン酸を加えた。Table 4に示したように、FITC-デキストランの透過性も、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の変化も観察されなかった。  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下で、  $\text{Ca}^{2+}$  流入が増大しなかったことは、オレイン酸の作用発現には、外から入った  $\text{Ca}^{2+}$  による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  レベルの増加が、不可欠であることを示している。

Table 4 Effect of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  on the absorption enhancement of oleic acid

Extracellular $\text{Ca}^{2+}$	Oleic acid	Permeability ratio	Intracellular $\text{Ca}^{2+}$ peak level ratio
1.8mM	None	1.0	1.0
1.8mM	1%	4.2	33.5
Free	1%	1.1	3.8

The bathing medium was Earle's balanced salt solution with or without  $\text{Ca}^{2+}$ . The permeability ratio was determined from the transferred amount of FITC-dextran after 2 h incubation. The value was the mean of four experiments. The standard error was less than 10% in each case.

#### 吸収促進作用に対する細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 伝達系阻害剤の影響

オレイン酸の吸収作用メカニズムを解明するため、オレイン酸 1%添加時に、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ が関与するプロセスを阻害する各種化合物を併用した。Table 5に示したように、カルモジュリン (CAM) 阻害剤、W-7、Compound 48/80、CAMキナーゼ阻害剤、KN-62、HDBA は、オレイン酸による吸収促進を濃度依存的に抑制し、高濃度側では、ほぼ完全に抑制した。他にオレイン酸の作用を抑制したのは、プロテインキナーゼC (PKC) の阻害剤であるH-7、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  キレートであるTMB-8であった。しかし、他のプロテインキナーゼ、ホスホリパーゼ、ジアシルグリセロール (DAG) キナーゼ、DAGリパーゼ阻害剤はいずれも抑制効果がなかった。また、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルブロッカーであるニフェジピン、ベラパミルは、わずかに抑制する作用が認められたが、その作用は弱かった。なお、阻害剤単独では、いずれも透過性には影響を及ぼさなかった。

#### 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇に及ぼす細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 伝達系阻害剤の影響

上記実験と同条件で、オレイン酸 1%添加後の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ を測定し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 伝達系阻害剤のオレイン酸に対する抑制効果を調べた。Table 5に示したように、吸収促進作用への抑制効果と良く相関した結果が得られ、オレイン酸による透過性の促進を抑制したCAM阻害剤、CAM キナーゼ阻害剤は、 $\text{Ca}^{2+}$ 細胞内レベルの上昇に対しても抑制的に働いた。なお、阻害剤単独では、いずれも細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ を増大させることはなかった。

Table 5 Effect of Ca<sup>2+</sup>-regulatory protein-inhibitors on absorption enhancement and intracellular Ca<sup>2+</sup> rise by oleic acid

Inhibitor	Target	Concentration <sup>a)</sup>	Inhibition ratio (%) <sup>b)</sup>	Reference
W-7	CAM	10 $\mu$ M 50 $\mu$ M 250 $\mu$ M	9.2/NEc 43.7/31.5 99.7/92.2	49
Compound 48/80	CAM	10 $\mu$ g/ml 30 $\mu$ g/ml 100 $\mu$ g/ml	79.8/72.4 88.0/91.7 97.5/98.8	50
KN-62	CAM kinase	1 $\mu$ M 3 $\mu$ M 10 $\mu$ M	55.3/68.7 75.8/87.3 87.4/92.4	49
HDBA	CAM kinase	1 $\mu$ M 3 $\mu$ M 10 $\mu$ M	43.2/33.5 87.3/80.3 91.3/98.1	51
H-89	PKA	1 $\mu$ M 3 $\mu$ M 10 $\mu$ M	NE/NE NE/NE NE/NE	49
H-7	PKC	1 $\mu$ M 3 $\mu$ M 10 $\mu$ M	NE/NE 8.9/11.9 32.3/38.7	49
ML-9	MLC kinase	1 $\mu$ M 3 $\mu$ M 10 $\mu$ M	NE/NE NE/NE NE/NE	49
U-73122	PLC	1 $\mu$ M 3 $\mu$ M 10 $\mu$ M	NE/NE NE/NE NE/NE	52
RHC80267	DAG lipase	1 $\mu$ M 3 $\mu$ M 10 $\mu$ M	NE/NE NE/NE NE/NE	53
R59949	DAG kinase	1 $\mu$ M 3 $\mu$ M 10 $\mu$ M	NE/NE NE/NE NE/NE	54
Nifedipine	Ca <sup>2+</sup> channel	0.1 $\mu$ M 1 $\mu$ M 10 $\mu$ M	NE/NE 47.3/40.4 43.6/50.6	55
Verapamil	Ca <sup>2+</sup> channel	1 $\mu$ M 10 $\mu$ M 100 $\mu$ M	NE/NE NE/NE 32.7/44.7	55
TMB-8	Ca <sup>2+</sup> chelator	10 $\mu$ M 30 $\mu$ M 100 $\mu$ M	NE/NDd 43.1/ND 78.9/ND	56

- a) Effective concentrations of inhibitors were chosen from those in the cited literature.  
b) The values show the inhibition ratios in FITC-dextran absorption enhancement (left) and intracellular Ca<sup>2+</sup> rise (right). The standard error was less than 15% in each case. (n=4)  
c) No effect (inhibition ratio: <5%), d) Not determined.

## 考察

最近Wangら<sup>48)</sup>は、オレイン酸などの脂肪酸が初代培養肺胞細胞膜上の $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルに直接もしくは間接的に作用することにより $\text{Ca}^{2+}$ 流入を増大させ、その結果tight junctionが<sup>s</sup>開孔し、単細胞層透過性が上昇することを示した。本研究でオレイン酸による同様な作用をA549細胞でも認めた。また、DMBCD、タウロコール酸による吸収促進作用が、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ と関連していないことが明らかとなり、オレイン酸特有の作用機序と考えられた。DMBCD、タウロコール酸は、すでに報告されている別の機序、すなわち直接的な細胞膜への障害や細胞膜内での反転ミセル形成により、その促進作用を発現すると推察される<sup>57,58)</sup>。オレイン酸による $\text{Ca}^{2+}$ の細胞内への流入を亢進させる作用は、他組織細胞でも見られており、肺胞細胞に特異的でない<sup>59)</sup>。また、上皮細胞内への $\text{Ca}^{2+}$ の流入が、tight junctionをゆるめ、透過性を増大させることは、すでに気管上皮で確認されている<sup>60)</sup>。

CAMアンタゴニスト及びCAM キナーゼの阻害剤が、オレイン酸による吸収促進、 $\text{Ca}^{2+}$ 流入の増大を抑制したことは、それらの機序にCAMとCAM キナーゼが関与していることを強く示唆する。そして、オレイン酸が $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルを介してペプチド・蛋白制御に関係していると考えられる。CAMアンタゴニストが $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルを抑制することは、多様な細胞を用いた実験で観察されており<sup>55,61-63)</sup>、しかも、 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル ブロッカーの $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルへの結合はW-7によって阻止されるからである。H-7が<sup>s</sup>弱いながらもオレイン酸の促進作用に抑制的な効果を示したことからPKCも関与していると思われる。一方、 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル ブロッカーのオレイン酸に対する抑制作用は部分的であり、Wangら<sup>48)</sup>の結果と一致している。 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルは、ニフェジピンやベラパミルなどジヒドロピリジン誘導体(DHP)に感受性を示すチャンネルだけでなく、レセプター-作動性 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル、セカンドメッセンジャー作動性 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルなど多様であり<sup>64)</sup>、オレイン酸はDHP-非感受性の $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルを主として活性化するのもかもしれない。なお、ホスホリパーゼ C、DAGキナーゼ、DAGリパーゼはオレイン酸の促進作用に関与している可能性が低いと思われる。

最後に、オレイン酸が細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の上昇を引き起こすメカニズムについて推論した(Figure 15)。オレイン酸は、CAM様作用を発揮することが知られている<sup>65)</sup>。オレイン酸は $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルと関連しているCAMキナーゼを活性化し、それによって $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルが活性化され、 $\text{Ca}^{2+}$ 流入が引き起こされると考えられる。CAM阻害剤は、オレイン酸のCAM キナーゼへの結合を、CAM キナーゼ阻害剤はCAMの標的部位である $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルの活性化を阻止すると思われる。この推論は、上昇した細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ が、どういう過程を経て tight junctionの開孔を引き起こすかも含めて今後検証されなければならない。そして、A549細胞を用いて得た今回の結果は、初代肺胞細胞や他の粘膜上皮細胞で得られる結果とは必ずしも一致しない可能性があることは念頭に置く必要がある。以上、オレイン酸の吸収促進作用に細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 、CAM・CAMキナーゼそして $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルが関与していることを明ら

かにした。吸収促進剤のメカニズムを解明は、より安全な吸収促進剤の利用につながると思われる。

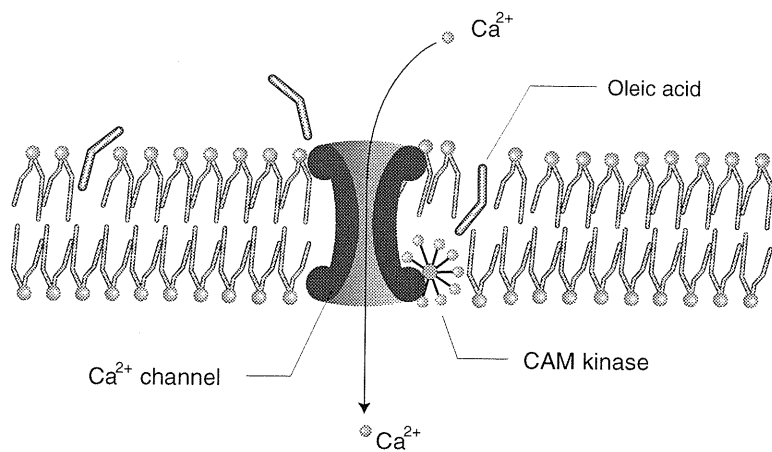


Figure 15. Activation of calcium influx by oleic acid on the cellular membrane.

## 第5章 サケカルシトニンドライパウダーのラットにおける経肺吸収<sup>66)</sup>

### 序論

ここ数年、経肺投与によるペプチド・蛋白のデリバリーに関する報告が増えてきており、有効な非侵襲性投与経路として期待されている<sup>43,67,68)</sup>。とくに、従来溶液投与が主であった中で、パウダー化した製剤を小動物に投与した実験は、臨床で使用される剤形を想定しており興味深い。経肺投与は、他の非侵襲性投与経路よりも良好な吸収が期待される。しかし、分子量の大きな薬物のバイオアベイラビリティは、肺胞上皮での透過バリアーにより決して十分でなく、吸収促進剤の利用が検討される。吸収促進剤の作用は、溶液で薬物と同時に投与する方法が一般であり、ドライパウダー化した製剤に促進剤を利用した報告はKomadaら<sup>67)</sup>の報告のみである。そこで、本研究では、カルシトニン経肺吸収における溶液製剤とパウダー化製剤間で、各種吸収促進剤の作用を比較検討し、ドライパウダー化の有用性を考察した。

### 材料と方法

#### 試薬

オレイン酸ナトリウム、卵黄レシチンは、日本油脂より入手した。n-オクタシル- $\beta$ -D-グルコシド、は、和光純薬製を用いた。他の試薬は、前章までに使用した物と同じである。

#### 製剤

カルシトニン溶液：カルシトニンを生理食塩水で溶解、希釈し、液剤とした。

カルシトニンドライパウダー：精製水で溶解した乳糖溶液中でカルシトニンを溶解し、凍結乾燥した。吸収促進剤は乳糖と一緒に添加した。これをジェットミルで微粉碎し、投与用のドライパウダーを得た。このドライパウダーの粒径をAEROSIZERで測定した結果、 $\phi$  2~4 $\mu$ mに70%が分布していた。カルシトニン1 $\mu$ g/kg、20 $\mu$ g/kg投与では、ドライパウダー5mg/dose中のカルシトニン含量は、0.3 $\mu$ g、6 $\mu$ gであった。

## 動物実験

SD系雄性ラット7週齢（体重280～300 g）のラットを用いた。1群あたりの匹数は4～6とした。経肺投与は、第1章に述べた方法にてラットに麻酔下で気管カニューレーションを施した。溶液投与では、立位保持したラットに、薬液100 $\mu$ lをマイクロシリンジにて、カニューレを通して肺内へ注入した。ドライパウダー投与では、溶液投与と同様に気管カニューレーションを施し、体外のカニューレ先端に、投与デバイス(Figure 16)を装着した。そしてチップ内（100 $\mu$ l用ピペット用チップ）のドライパウダー5mgをエアーポンプによる送風で、強制的に肺内へ送達させた。送風時には、Y字型コネクターのチップ装着側と反対側のチューブを指で閉塞し、電磁弁を0.3秒間開放した。送風量は3mlであった。送風後、直ちに吸入した空気を逃がすために閉塞した側のチューブを開き、デバイスを外した。このデバイスを用いた吸入による肺組織へのダメージは、少なくとも実体顕微鏡観察では認められなかった。筋肉内投与は、液剤0.2mlを大腿筋より注射した。

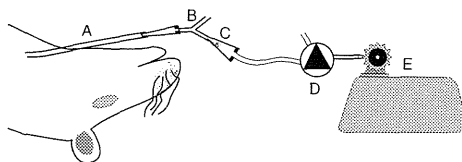


Figure 16. Device designed for delivery of dry powder to rat lungs.  
A: polyethylene tube for cannulation. B: Y-shap polyethylene tube.  
C: dry powder in a plastic tip. D: electromagnetic valve. E: air pump.

## サケカルシトニンのアッセイ

第1章と第3章で用いたのと同じ方法で、カルシトニンの生物学的活性と血漿中レベルを測定した。

## 肺内分布の測定

カルシトニンと同様にFITC-デキストラン（分子量150,000）の液剤とドライパウダーを用意し、ラットへ経気管内投与した。投与後、直ちに肺を摘出し、右肺の3葉（上葉、中葉、下葉）、左肺は長軸に添って均等に切除した2葉（上葉、下葉）各片を2ml生食中でホモジェネートし、3,000xgで遠心分離後、上清中の蛍光強度を測定した。各葉内に含まれるFITC-デキストラン量を求め、肺内への到達率、分布率を計算した。

## 結果

### ドライパウダーと溶液によるカルシトニンのラットにおける経肺吸収

Figure 17に、3つの吸収促進剤（オレイン酸、レシチン、クエン酸）を添加したカルシトニンドライパウダーの吸収を示した。吸収促進剤を添加した処方では、血漿中カルシトニンレベルは促進剤非添加群に比べ高く、吸収は顕著に増大した。吸収促進剤非添加群に比べ、 $C_{max}$ はオレイン酸>クエン酸>レシチンの順に、2.7倍、2.2倍、1.8倍と増大した。薬効の指標である血漿中カルシウムレベルの低下でも、カルシトニンレベルと連動した形で変化した。

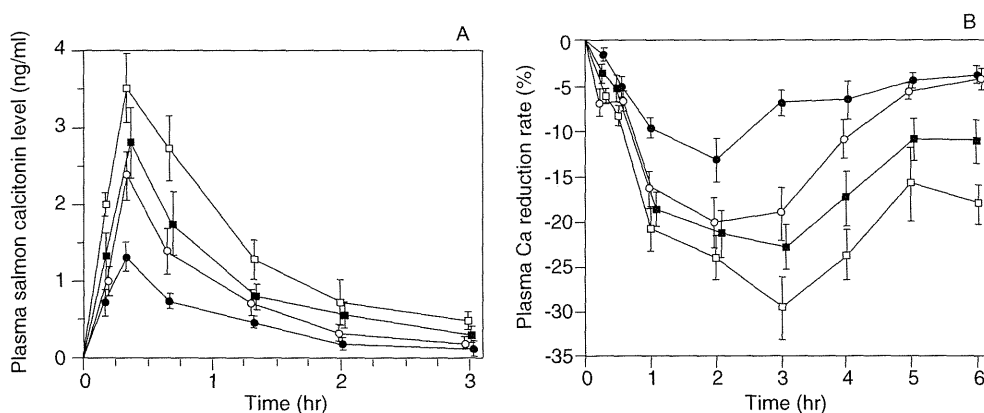


Figure 17-(A),(B). Pulmonary absorption of calcitonin from dry powder in rats with absorptin enhancers: Oleic acid (□), citric acid (■), lecithin (○) and none (●). Values shown are means ± SE (n=4-6) of plasma calcitonin level (A) and plasma calcium reduction rate (B). Absorption enhancers were given at 250 μg/5mg dry powder/dose. The doses of calcitonin were 20 μg/kg (A) and 1 μg/kg (B), respectively.

吸収促進剤非添加群では、AUC、ACRともにドライパウダーと溶液投与間で、ほとんど差が認められなかった(Table 6)。ドライパウダーに促進剤を添加すると、促進剤の濃度に依存した吸収促進効果が得られた。しかし、溶液に吸収促進剤を添加した場合、DMBCDを除いて、ドライパウダーよりも促進効果は弱かった。特にオレイン酸はドライパウダーに少量添加しても強い吸収促進を示した(Figure 18)。



Table 6. Effect of absorption enhancers on the pulmonary absorption of salmon calcitonin from dry powder and solution in rats

Enhancer ( $\mu\text{g}/\text{dose}$ )		Dry powder		Solution	
		AUC (%) <sup>1)</sup>	ACR (%) <sup>2)</sup>	AUC (%) <sup>1)</sup>	ACR (%) <sup>2)</sup>
None		29 $\pm$ 5	34 $\pm$ 7	25 $\pm$ 6	30 $\pm$ 9
Oleic acid	25	43 $\pm$ 7 <sup>a,b3)</sup>	58 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	29 $\pm$ 9	34 $\pm$ 8
	250	80 $\pm$ 12 <sup>a,b</sup>	120 $\pm$ 25 <sup>a,b</sup>	40 $\pm$ 11	52 $\pm$ 16
DM $\beta$ CD	25	35 $\pm$ 9	39 $\pm$ 12	29 $\pm$ 8	31 $\pm$ 10
	250	60 $\pm$ 18 <sup>a</sup>	70 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	60 $\pm$ 12 <sup>a</sup>	76 $\pm$ 15 <sup>a</sup>
Lecithin	25	41 $\pm$ 12	46 $\pm$ 10	27 $\pm$ 9	30 $\pm$ 11
	250	53 $\pm$ 13 <sup>a,b</sup>	67 $\pm$ 16 <sup>a,b</sup>	38 $\pm$ 9	42 $\pm$ 10
Taurocholate	25	32 $\pm$ 8	36 $\pm$ 10	27 $\pm$ 5	31 $\pm$ 8
	250	54 $\pm$ 10 <sup>a,b</sup>	61 $\pm$ 13 <sup>a,b</sup>	34 $\pm$ 10	45 $\pm$ 9
O- $\beta$ -D-glucoside	25	30 $\pm$ 6	34 $\pm$ 9	26 $\pm$ 8	30 $\pm$ 10
	250	47 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	57 $\pm$ 14 <sup>a</sup>	34 $\pm$ 12	45 $\pm$ 14
Citric acid	25	41 $\pm$ 14	49 $\pm$ 13	27 $\pm$ 9	30 $\pm$ 8
	250	63 $\pm$ 12 <sup>a,b</sup>	66 $\pm$ 14 <sup>a,b</sup>	38 $\pm$ 7	42 $\pm$ 11

Dose of salmon calcitonin: 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Values shown are Means $\pm$ SE (n=4-6).

1) Area under the curve

2) Area of calcium reduction as a percentage of the value measured after intramuscular injection of salmon calcitonin at 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

3) Statistically significant difference ( $P<0.05$ )

a: between control group (without enhancer) and group given enhancer.

b: between group given dry powder and group given solution.

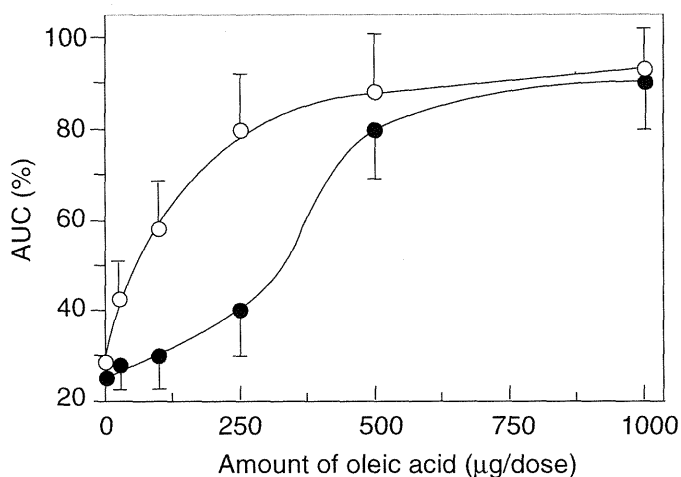


Figure 18. Effect of oleic acid on the pulmonary absorption of dry powders (○) and solutions (●) of calcitonin (1μg/kg) in rats. Values shown were means±SE (n=4~6). AUC(%) is the area under the curve as a percent of the value measured after intramuscular injection of calcitonin at the same dose.

## 肺内分布

Table 7に示したように、ドライパウダーと溶液では、到達量に有意な差は認められなかった。経肺投与したFITC-デキストランは、ドライパウダーと溶液のいずれも右肺に60%と偏った沈着分布を示した。また、両剤型とも右肺では中葉、下葉に、左肺では下葉に多くが到達した。しかし、ドライパウダーでは、両上葉への移行が若干少ない傾向が見られた。全投与量のうち、ドライパウダーでは50%、溶液は67%が肺内へ到達した。

Table 7 Deposition of FITC-labeled dextran in the rat lung after intratracheal administration

Preparation	Right lung				Left lung			Total lung
	Upper lobe	Middle lobe	Lower lobe	Total	Upper lobe	Lower lobe	Total	
Dry powder	6.2 <sup>a)</sup> ±2.4	35.6± 15.8	18.4± 7.6	60.2± 15.5	6.0± 2.4	33.8± 8.8	39.8± 10.6	50.1 <sup>b)</sup> ±6.8
Solution	16.1± 7.9	22.8± 8.7	22.6± 6.9	61.5± 12.8	15.5± 5.6	23.0± 7.2	38.5± 11.2	67.2±10.3

The values represent Means±SE (n=5).

a) Relative amount of FITC-labeled dextran delivered to each lobe, expressed as percentage of the sum of the left and right lungs.

b) Recovery rate expressed as percentage of the initial dose.

## 考察

溶液とエアゾール、パウダーを経肺投与した際、肺内での薬物の分布、吸収などに差が生じる<sup>6,43,68,69</sup>。本結果では、ドライパウダーと溶液間で、肺内への到達率、及び吸収促進剤非添加での吸収率に差は認められなかった。しかし、Komada<sup>67</sup>、Niven<sup>68</sup>はいくつかのペプチド、蛋白で溶液の方がドライパウダーより吸収されやすいと報告している。この相違は、投与したドライパウダーの粒子径、そして吸入方法の違いによると考えられる。

肺内での分布については、報告がまちまちである。今回の成績は、肺内到達率と合わせて、Okumura<sup>61</sup>の報告と近い値を得ている。また、右肺への偏った分布はNiven<sup>68</sup>とByron & Niven<sup>69</sup>の報告と一致した。なお、ドライパウダーの投与は自然吸入でなく、他の報告<sup>67,68</sup>と同様、強制的に吸入させている。しかし、送り込んだ空気量で肺上皮の透過性が影響を受けるとは思われない<sup>70</sup>。

本章の結果で、特に、注目すべき点は、同量の吸収促進剤を投与した場合、ドライパウダーの方が、溶液よりも強い吸収促進作用を発揮したことである。Komada<sup>67</sup>も、ドライパウダーにクエン酸を含有させることでインスリンの経肺吸収率が2倍ほど高くなると報告しているが、溶液でのクエン酸の促進作用については触れていない。ドライパウダーの方が、溶液よりも吸収促進が強い原因は、肺内の薬物の到達量や分布の違いから生じているのではなく、むしろ、ドライパウダーが、肺胞上皮に沈着し、肺胞液 (alveolar fluid) で溶解した時の吸収促進剤の濃度に着目すべきだと思われる。ラットでの肺胞上皮の吸収面積を $0.6\text{m}^2/300\text{g}$ 体重とした場合<sup>81</sup>、肺胞液の厚さ $5\text{nm}\sim 20\text{nm}$ <sup>91</sup>を掛けることにより肺胞液の量は $3\mu\text{l}\sim 12\mu\text{l}$ と推定される。すると、液量 $100\mu\text{l}$ の溶液投与では、促進剤の濃度はほとんど希釈されることなく同じ濃度で作用していると推測される。一方、ドライパウダーに吸収促進剤を含ませると、少量の肺胞液で溶解するため溶液投与よりも数十倍高濃度で作用すると考えられる。おそらく、この肺胞上皮上での吸収促進剤の濃度の大きな差が、ドライパウダーと溶液での促進剤の作用の程度の違いとなっているのであろう。

今回使用した吸収促進剤の作用機序について触れてみよう。吸収促進剤は、tight junctionを介したペプチド、蛋白の透過性を促進させると考えられている<sup>71</sup>。オレイン酸は、第4章で述べたように $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルとの関係が示唆される。タウロコール酸に関しては、複数のメカニズムが報告されている<sup>2,37,57</sup>。クエン酸に関しては、 $\text{Ca}^{2+}$ キレート作用によるアクチンフィラメントなど細胞内での変化<sup>71</sup>と、クエン酸による局所的な酸性化<sup>67</sup>がメカニズムとして考えられている。

ドライパウダーに吸収促進剤を添加する利点は何であろうか。一番大きな利点は、吸収促進剤の作用を薬物の透過部位に限定できることである。このことは促進剤を使用したときに見られる粘膜障害作用を最小限に抑え、促進剤の安全域を高めることにつながる。特に、オレイン酸、レシチンは、上市されている吸入用医薬品に分散剤として添加されており、さらなる検討に適している。ここに得られた知見は、経肺投与に適したより安全で有効な吸収促進剤の開発に有益な情報を提供すると考えられる。

## 結語

以上5章にわたり、サケカルシトニンをはじめとするペプチド・蛋白の経肺吸収について検討した。ここでは、各章を振り返りながら、経肺投与という製剤学的アプローチを実現させるための手がかりを述べたいと思う。

上記第1章の結果で示したようにカルシトニンのラットでの経肺吸収率は、同薬物の経鼻吸収など他の非侵襲性経粘膜投与経路よりも、良好であることが示された<sup>73)</sup>。これは、はじめに触れたように、吸収部位の広大な面積や肺胞上皮の薄さに起因すると考えられる。しかし、本研究のように気管カニューレションを介して投与すると投与量の60%以上を吸収部位である肺深部へと到達させることができる。ところが、実際の臨床では口腔内、咽頭、気管への付着により肺深部まで到達する量は、10~20%であり、臨床での吸収率を推定するには下方修正が必要である。そのため、臨床で使用するには、採算性、投与精度、投与量の再現性などの点から、肺深部への薬物送達率を向上させる吸入用投与デバイスが不可欠である。そして、肺胞上皮での吸収を可能な限り向上させる製剤学的な工夫も必要である。この目的を達成するために、第1章で経肺吸収における製剤学的な修飾について調べた結果、水溶性高分子化合物であるペプチド・蛋白に対して、透過バリアーと代謝バリアーが、その程度・性質の違いはあるにしても、他粘膜と同様に存在することが明らかとなった。

そこで著者は、臨床で使用されている吸入剤に分散剤として添加されているオレイン酸に着目し、その各種誘導体の吸収促進効果を評価した。その結果、ある種の吸収促進剤が経肺吸収でも非常に効果的であることが明らかとなった。また、ペプチド・蛋白分解酵素の阻害剤も強力な促進効果を示した。これらの結果から吸収促進剤のより積極的な応用を展開するには、ペプチド・蛋白の肺胞上皮での透過経路と、吸収促進剤の作用機序を解明することが重要と考えた。

第2章では、肺胞A549細胞株を用いた*in vitro*の薬物透過システムを用いて各種ペプチド・蛋白の透過性を調べ、それらの主透過経路は細胞間隙であることを明らかにした。

第3章では、透過バリアーと代謝バリアーのどちらを克服すれば効果的に吸収を向上できるのか検討した。その結果、ペプチドでは代謝バリアーが、蛋白では透過バリアーがより大きく寄与していることが明らかとなった。このことから一つの戦略が考えられる。すなわち、ペプチドの吸収促進には、酵素阻害剤等による分解抑制、化学修飾による酵素耐性な誘導体の開発、粘膜透過速度の促進による代謝酵素との接触時間の短縮化が有効な手法であると考えられる。事実、最後の製剤学的手法が有効であることは第1章で示された。逆に蛋白系薬物では安全で有効な透過促進剤を利用する方法が効果的であると思われる。そこで、ペプチド・蛋白両者の経肺吸収促進に関して、基礎的・応用的な研究を進めた。

まず、第4章での研究により、有効な吸収促進剤であるオレイン酸の作用機序を調べた。

その結果、オレイン酸は、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 制御に働きかけ、tight junctionをゆるめ、細胞間隙の薬物透過量を増大させるものと推察された。透過促進剤の機序を解明することで、優れた促進剤を積極的に開発する新たなアプローチを開いてくれると考えられる。

最終章では、第1章から第4章において得られた結果をもとに、臨床で投与される剤形を考慮し、ドライパウダー処方を用いた*in vivo*実験を実施した。吸収促進剤をドライパウダー中に配合することで溶液よりも顕著な吸収促進効果が得られることを実証した。これは、効果と安全性の点から臨床応用が十分期待できることを示唆する優れた成果であると考えている。

以上、著者はペプチド・蛋白の経肺吸収は、非侵襲性の投与経路として、臨床への応用に値するポテンシャルを持つことを明らかにした。また、吸収部位である肺胞上皮の代謝バリアーと透過バリアーは製剤学的な工夫により克服しうることを呈示した。今後、さらなる基礎的な検討を加え、臨床での剤形により近い、安全で有効な製剤を創製するべく、研究を進展させたいと考えている。本研究を通し、ペプチド・蛋白の経肺吸収というホットな研究領域において、いくらかでも貢献できれば幸いである。

## 謝辞

本研究に際し、城西大学薬学部教授 從二和彦先生には、終始親身なるご指導、ご助言を賜り、心より厚く感謝の意を表します。また、研究の進展にお力添えを頂きましたヘキストジャパン株式会社 近藤修二氏に、そして貴重な御意見をいただきました教室関係諸氏にお礼申し上げます。

## 引用文献

1. Lee, V.H. (1990) Protease inhibitors and penetration enhancers as approaches to modify peptide absorption. *J. Controlled Rel.* 13: 213-223.
2. Lee, V. H., Yamamoto,A. and Kompella,U. B.(1991) Mucosal penetration enhancers for facilitation of peptide and protein drug absorption. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 8: 91-19.
3. Wearley, L.L. (1991) Recent progress in protein and peptide delivery by noninvasive routes. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 8: 331-394.
4. Hanson, M., Gazdick, G., Gahill, J. and Augustine., M. (1986) Intranasal delivery of the peptide, salmon calcitonin. pp. 233-242. In *Delivery Systems for Peptide Drugs*. ed. by Davis, S., S. et al, Plenum Press, London.
5. Patton, J.S. and Platz, R.M. (1992) (D) Routes of delivery: Case studies, (2) Pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 8: 179-196.
6. Okumura, K., Iwakawa, S., Yoshida, T. Seki, T. and Komada, F. (1992) Intratracheal delivery of insulin absorption from solution and aerosol by rat lung *Int. J. Pharmaceut.* 88:63-73.
7. Köhler, D. (1993) Systemic therapy with aerosols. pp.303-319. In *Aerosols in Medicine ( Principles, Diagnosis and Therapy)*. ed. by Morén, F. et al, Elsevier, Amsterdam.
8. Weibel, E. R. (1979) Oxygen demand and the size of respiratory structures in mammals. pp.289-346. In *Evolution of respiratory processes a comparative approach*. ed. by Wood, S., C. and Lenfant, L., Marcel Dekker Inc., New York.
9. Weibel, E. R. (1970/71) Morphometric estimation of pulmonary diffusion capacity. *Resp. Physiol.* 11:54-75.
10. Adjei, A., Sundberg, D., Miller, J. and Chun, A. (1992) Bioavailability of leuprolide acetate following nasal and inhalation delivery to rats and healthy humans. *Pharm. Res.* 9: 244-249.



11. Hoover, J., J., Rush, B., D., Wilkinson, K., F., Day, J., S., Burton, P., S., Vidmar, T., J. and Ruwart, M., J. (1992) Peptides are better absorbed from the lung than the gut in the rat. *Pharm. Res.* 9: 1103-1106.
12. Patton, J.S., Trincherio, T. and Platz, R.M. (1994) Bioavailability of pulmonary delivered peptides and proteins:  $\alpha$ -interferon, calcitonins and parathyroid hormones. *J. Contr. Release* 28: 79-85.
13. Kobayashi, S., Kondo, S. and Juni, K. (1994) Study on pulmonary delivery of salmon calcitonin in rats, Effects of protease inhibitors and absorption enhancers. *Pharm. Res.* 11:1239-1243.
14. Liu, F-y, Kildsig, D.O. and Mitra, A.K. (1992) Pulmonary biotransformation of insulin in rat and rabbit. *Life Sci.* 51:1683-1689.
15. Yamamoto, A., Umemori, S. and Muranishi, S. (1994) Absorption enhancement of intrapulmonary administered insulin by various absorption enhancers and protease inhibitors in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 14-18.
16. Enna, S.J. and Schanker, L.S. (1972) Absorption of saccharides and urea from the rat lung. *Am. J. Physiol.* 222: 409-414.
17. Gillespie, M.N., Krechniak, J.W., Crooks, P.A., Altieri, R.J. and Olson, J.W. (1985) Pulmonary metabolism of exogenous enkephalins in isolated perfused rat lungs. *J. Pharm. Exp. Ther.* 232: 675-681.
18. Stimler-Gerard, N.P. (1987) Neutral endopeptidase-like enzyme controls the contractile activity of substance P in guinea pig lung. *J. Clin. Invest.* 79: 1819-1825.
19. Nakada, Y., Miyake, M. and Awata, N. (1993) Some factors affecting the vaginal absorption of human calcitonin in rats. *Int. J. Pharmaceut.* 89: 169-175.
20. Niven, R.W. and Byron, P.R. (1990) Solute absorption from the airways of the isolated rat lung. II. Effect of surfactants on absorption of fluorescein. *Pharm. Res.* 7: 8-13.

21. Kobayashi, S., Kondo, S. and Juni, K. (1995) Permeability of peptides and proteins in human cultured alveolar A549 cell monolayer. *Pharm. Res.* 12: 1115-1119.
22. Fujita, T., Yamamoto, A. and Muranishi, S. (1993) Comparison of permeability of macromolecular drugs across cultured intestinal and alveolar epithelial cell lines. International Symposium. Delivery of Protein Drugs - The Next 10 Years, September 4-9, Kyoto, Japan.
23. Yamahara, H., Lehr, C.M., Lee, V.H.L. and Kim, K.J. (1994) Fate of insulin during transit across rat alveolar epithelial cell monolayers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 40: 294-298.
24. Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W. and Todaro, G. (1976) A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer* 17: 62-70.
25. Johnson, L.G., Cheng, P.W. and Boucher, R.C. (1989) Albumin absorption by canine bronchial epithelium. *Am. J. Appl. Physiol.* 66: 2772-2777.
26. Theodore, J., Robin, E.D., Gaudio, R. and Acevedo, J. (1975) Transalveolar transport of large polar solutes (sucrose, inulin, and dextran). *Am. J. Physiol.* 229: 989-996.
27. Gorin, A.B. and Stewart, P.A. (1979) Differential permeability of endothelial and epithelial barriers to albumin flux. *J. Appl. Physiol.* 47: 1315-1324.
28. Byron, P.R. and Phillips, E.M. (1990) Absorption, clearance, and dissolution in the lung. pp. 112. In *Respiratory Drug Delivery*. CRC Press, Florida.
29. Thwaites, D.T., Hirst, B.H. and Simmons, N.L. (1993) Passive transepithelial absorption of thyrotropin-releasing hormone (TRH) via a paracellular route in cultured intestinal and renal epithelial cell lines. *Pharm. Res.* 10: 674-681.
30. Schneeberger, E.E. (1980) Heterogeneity of tight junction morphology in extrapulmonary and intrapulmonary airways of the rat. *Anat. Rec.* 198: 193-208.

31. Effros, R.M. and Mason, G.R. (1983) Measurements of pulmonary epithelial permeability in vivo. *Am Rev. Resp. Dis.* 127: S59-S61.
32. Fisher, A.N., Brown, K., Davis, S.S.(1987) The effect of molecular size on the nasal absorption of water-soluble compounds in the albino rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 39: 357-362.
33. Kobayashi, S., Kondo, S. and Juni, K. (1996) Critical factors on pulmonary absorption of peptides and proteins (Permeation barrier and metabolic barrier). *Eur. J. Pharm. Sci.* (accepted).
34. Ohtani, T., Murakami, M., Yamamoto, A, Takada, K. and Muranishi, S. (1991) Effect of absorption enhancers on pulmonary absorption of fluorescein isothiocyanate dextrans with various molecular weights. *Int. J. Pharmaceut.* 77: 141-150.
35. Niven, R.W., Rypacek, F. and Byron, P.R. (1990) Solute absorption from the airways of the isolated rat lung. III. Absorption of several peptidase-resistant, synthetic polypeptides: Poly-(2-hydroxyethyl)-aspartamides. *Pharm. Res.* 7: 990-994.
36. McMartin, C., Hutchinson, L.E.F., Hyde, R. and Peters, G.E. (1987) Analysis of structural requirements for the absorption of drugs and macromolecules from the nasal cavity. *J. Pharm. Sci.* 76: 535-540.
37. Morita, T., Yamamoto, A., Takakura, Y., Hashida, M. and Sezaki, H. (1994) Improvement of the pulmonary absorption of (Asu<sup>1,7</sup>)-eel calcitonin by various protease inhibitors in rats. *Pharm. Res.* 11: 909-913.
38. Morimoto, K., Yamaguchi, H., Iwakura, Y., Miyazaki, M., Nakatani, E., Iwamoto, T., Ohashi, Y. and Nakai, Y. (1991) Effects of proteolytic enzyme inhibitors on the nasal absorption of vasopressin and an analogue. *Pharm. Res.* 8: 1175-1179.
39. Adjei, A.L. and Carrigan, P.J. (1992) Pulmonary bioavailability of LH-RH analogs: Some biopharmaceutical guidelines. *J. Biopharm. Sci.* 3: 247-254.

40. Smith, P.L., Marcello, J., Chiossone, D.C., Orner, D., Hidalgo, I.J. (1994) Absorption of an RGD peptide (SK & F 106760) following intratracheal administration in rats. *Int. J. Pharmaceut.* 106: 95-101.
41. Folkesson, H.G., Weström, B.R. and Karlsson, B.W. (1990) Permeability of the respiratory tract to different-sized macromolecules after intratracheal instillation in young and adult rats. *Acta Physiol. Scand.* 139: 347-354.
42. Liu, F-y, Shao, Z., Kildsig, D.O. and Mitra, A.K. (1993) Pulmonary delivery of free and liposomal insulin. *Pharm. Res.* 10: 228-232.
43. Colthorpe, P., Farr, S.J., Taylor, G., Smith, I.J. and Wyatt, D. (1992) The pharmacokinetics of pulmonary-delivered insulin: A comparison of intratracheal and aerosol administration to the rabbit. *Pharm. Res.* 9: 764-768.
44. Niven, R.W., Lott, F.D. and Cribbs, J.M. (1993) Pulmonary absorption of recombinant methionyl human granulocyte colony stimulating factor (r-huG-CSF) after intratracheal instillation to the hamster. *Pharm. Res.* 10: 1604-1610.
45. Patton, J.S., McCabe, J.G., Hansen, S.E. and Daugherty, A.L. (1989-1990) Absorption of human growth hormone from the rat lung. *Biotech. Therap.* 1: 213-228.
46. Colthorpe, P., Farr, S.J., Smith, I.J., Wyatt, D. and Taylor, G. (1995) The influence of regional deposition on the pharmacokinetics of pulmonary-delivered human growth hormone in rabbits. *Pharma. Res.* 12: 356-359.
47. Kobayashi, S., Kondo, S. and Juni, K. (1996) Permeability enhancing effect of oleic acid and its mechanism in humna alveolar A549 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* (printing).
48. Wang, L.Y., Ma, J.K.H., Pan, W.F., Toledo-Velasquez, D., Malanga, C.J. and Rojanasakul, Y. (1994) Alveolar permeability enhancement by oleic acid and related fatty acids: Evidence for a calcium-dependent mechanism. *Pharm. Res.* 11: 513-517.

49. Hidaka, H., Watanabe, M. and Kobayashi, R. (1991) Properties and use of H-series compounds as protein kinase inhibitors. *Methods in Enzymology* 201: 328-329.
50. Gietzen, K. (1983) Comparison of the calmodulin antagonists compound 48/80 and calmidazolium. *Biochem. J.* 216: 611-616.
51. O'Dell, T.J., Kandel, E.R. and Grant, S.G.N. (1991) Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors. *Nature* 353: 558-560.
52. Smith, R.J., Sam, L.M., Justen, J.M., Bundy, G.L., Bala, G.A. and Bleasdale, J.E. (1990) Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: Effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 253: 688-697.
53. Sutherland, C.A. and Amin, D. (1982) Relative activities of rat and dog platelet phospholipase A2 and diglyceride lipase: Selective inhibition of diglyceride lipase by RHC 80267. *J. Biol. Chem.* 257: 14006-14010.
54. Spedding, M. (1987) Interaction of phorbol esters with  $Ca^{2+}$  channels in smooth muscle. *Br. J. Pharmac.* 91: 377-384.
55. Luchowski, E.M., Yousif, F., Triggle, D.J., Maurer, S.C. Sarmiento, J.G. and Janis, R.A. (1984) Effects of metal cations and calmodulin antagonists on [ $^3H$ ] nitrendipine binding in smooth and cardiac muscle. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 230: 607-613.
56. Rangachari, P.K., Donoff, B. and McWade, D. (1987) Effects of TMB-8, a calcium antagonist, on transport properties of the isolated canine tracheal epithelium. *Biochim. Biophys. Acta.* 905: 311-319.
57. Shao, Z., Krishnamoorthy, R. and Mitra, A.K. (1992) Cyclodextrins as nasal absorption promoters of insulin: Mechanistic evaluations. *Pharm. Res.* 9: 1157-1163.
58. Gordon, G.S., Moses, A.C., Silver, R.D., Flier, J.S. and Carey, M.C. (1985) Nasal absorption of insulin: Enhancement by hydrophobic bile salts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7419-7423 (1985).

59. Huang, J.M.C., Xian, H. and Bacaner, M. (1992) Long-chain fatty acids activate calcium channels in ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6452-6456.
60. Bhat, M., Toledo-Velasques, D., Wang, L.Y., Malanga, C.J. Ma, J.K.H. and Rojanasakul, Y. (1993) Regulation of tight junction permeability by calcium mediators and cell cytoskeleton in rabbit tracheal epithelium. *Pharm. Res.* 10: 991-997.
61. Nakazawa, K., Higo, K., Abe, K., Tanaka, Y., Saito, H. and Matsuki, N. (1993) Blockade by calmodulin inhibitors of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in smooth muscle from rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 109: 137-141.
62. Greenberg, D.A., Carpenter, C.L. and Messing, R.O. (1987) Interaction of calmodulin inhibitors and protein kinase C inhibitors with voltage-dependent calcium channels. *Brain Res.* 404: 401-404.
63. Koyama, K. and Himori, N. (1988) Simultaneous assessment of effects of calmodulin antagonists and  $\text{Ca}^{++}$  channel blockers on the electrophysiological and mechanical characteristics in excised guinea-pig papillary muscles. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 292: 141-156.
64. Tsien, R.W. and Tsien, R.Y. (1990) Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu. Rev. Cell Biol.* 715-760.
65. Niggli, V., Adunyah, E.S. and Carafoli, E. (1981) Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 256: 8588-8592.
66. Kobayashi, S., Kondo, S. and Juni, K. (1996) Pulmonary absorption of salmon calcitonin dry powders containing absorption enhancers in rats. *Pharm. Res.* 13: 80-83.
67. Komada, F., Iwakawa, S., Yamamoto, N., Sakakibara, H. and Okumura, K. (1994) Intratracheal delivery of peptide and protein agents: Absorption from solution and dry powder by rat lung. *J. Pharm. Sci.* 83: 863-867.

68. Niven, R. W., Lott, F. D., Ip, A. Y. and Cribbs, J. M.(1994) Pulmonary delivery of powders and solutions containing recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) to the rabbit. *Pharm. Res.* 11: 1101-1109.
69. Byron, P. R. and Niven, R. W. (1988) A novel dosing method for drug administration to the airways of the isolated perfused rat lung. *J. Pharm. Sci.* 77: 693-695.
70. Crandal, E. D.. (1983) Water and nonelectrolyte transport across alveolar epithelium. *Am. Rev. Resp. Dis.* 127: S16-524.
71. Hochman, J. and Artursson, P.(1994) Mechanisms of absorption enhancement and tight junction regulation. *J. Contr. Release* 29: 253-267.